UNTERSUCHUNGEN AN MUTANTEN IM LIPOPROTEIN VON ESCHERICHIA COLI

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhards-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
HEINZ ROTERING
aus Göppingen

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548921_0073

UNTERSUCHUNGEN AN MUTANTEN IM LIPOPROTEIN VON ESCHERICHIA COLI

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhards-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
HEINZ ROTERING
aus Göppingen

1980

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 3. 1980
Dekan: Professor Dr. W. Seyffert
1. Berichterstatter Professor Dr. V. Braun
2. Berichterstatter Priv. Doz. Dr. K. Hantke

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

SOFORTDRUCK H. G. VOGLER TÜBINGEN

Meinen Eltern
Berta und Josef Rotering
gewidmet.

Meiner Frau
Sigrid Rotering-Steinberg
danke ich für Geduld und
Hilfe bei der Anfertigung
dieser Arbeit.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, der Universität Tübingen unter Anleitung von Professor Dr. V. Braun durchgeführt.

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. Volkmar Braun für die Überlassung des Themas sowie für großzügige Unterstützung und gute Betreuung bei der Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Y. Hirota, National Institute of Genetics, Misima, Japan, danke ich für die Bereitstellung von wichtigen, in dieser Arbeit untersuchten Bakterienstämmen und für hilfreiche Diskussionen.

Herrn Professor Dr. G. Zundel danke ich für die Möglichkeit, die Infrarotspektren in seinem Labor an der Universität München aufnehmen zu können und für Hilfe bei der Interpretation der Spektren.

Für tatkräftige Hilfe bei der Durchführung mehrerer Experimente gilt mein Dank Fräulein Helga Wolff und Herrn Nikolaos Dimoudis.

Auch allen übrigen Mitarbeitern der Lehrstühle I und II möchte ich für gute Zusammenarbeit danken.

Für die Gewährung eines Promotionsstipendiums danke ich der Studienstiftung des Deutschen Volkes.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
	ABKÜRZUNGEN	1
1.	EINLEITUNG	2
2.	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1.	Materialien	8
2.1.1.	Chemikalien	8
2.1.2.	Nährmedien	9
2.1.3.	Bakterienstämme und Bakteriophagen	11
2.1.3.1.	Bakterienstämme aus der Stammsammlung Mikrobiologie II, Tübingen	11
2.1.3.2.	Bakterienstämme von Yukinori HIROTA	12
2.1.3.3.	Stämme mit P 1-transduziertem lpp-Genbereich	13
2.1.3.4.	Bakteriophagen	14
2.2.	Methoden	14
2.2.1.	Anzucht der Bakterien	14
2.2.2.	Isolierung von Murein-Lipoprotein-Komplex (MMLP)	15
2.2.3.	Isolierung von Murein-Lipoprotein (LP I)	16
2.2.4.	Isolierung von Lipoprotein mit Trypsin (LP II)	16
2.2.5.	Isolierung von freiem Lipoprotein (FLP)	16
2.2.6.	Lipid-Extraktion von Murein-Lipoprotein-Komplex und freiem Lipoprotein	18
2.2.7.	Aminosäureanalysen	18
2.2.7.1.	Probenvorbereitung: Perameisensäure-oxidation	18
2.2.7.2.	Probenvorbereitung: Hydrolyse	19
2.2.7.3.	Analysen	19
2.2.8.	Trypsinspaltung von Murein-Lipoprotein-Komplex	20

2.2.9.	Pronasespaltung von Murein-Lipoprotein-Komplex	20
2.2.10.	Lipidanalytik: Quantitative Fettsäurebestimmung	21
2.2.10.1.	Hydrolyse	21
2.2.10.2.	Veresterung der Fettsäuren	21
2.2.10.2.1.	Herstellung einer Lösung von Diazomethan in Äther	21
2.2.10.2.2.	Veresterung der Fettsäuren mit Diazomethan	22
2.2.10.3.	Gaschromatographie	22
2.2.10.4.	Extraktion von Lipiden nach FOLCH und LEES	23
2.2.10.5.	Bestimmung der Radioaktivität von extrahierten Lipiden	23
2.2.10.6.	Trennung von extrahierten Lipiden mit Dünnschicht-Chromatographie	24
2.2.11.	Spektroskopische Untersuchungen	25
2.2.11.1.	Circulardichroismusmessungen	25
2.2.11.1.1.	Probenvorbereitung	25
2.2.11.1.2.	Messung des Circulardichroismus	25
2.2.11.1.3.	Bestimmung der Micellenbildung in NaDS-Lösungen	26
2.2.11.1.4.	Chromatographie auf Sephadex G 75 zur Entfernung von NaDS	26
2.2.11.2.	Infrarot-Spektroskopie	27
2.2.12.	Membrantrennung	27
2.2.13.	Proteinbestimmung nach LOWRY	28
2.2.14.	KDO-Bestimmung	28
2.2.15.	NaDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.2.16.	Anfärben von Polyacrylamid-Gelen	30
2.2.17.	Aufnahme von Cytidinmonophosphat (5'CMP)	30
2.2.18.	Tests für genetische Untersuchungen	31
2.2.18.1.	Phagentest: Bestimmung der "plating efficiency"	31
2.2.18.2.	Colicin M-Tropftest	31
2.2.18.3.	Globomycin-Querstrichtest	32
2.2.18.4.	Optischer EDTA/Lysozymtest	32

2.2.18.5.	Kurieren von Hfr- und F^+-Zellen mit NaDS	32
2.2.18.6.	Bestimmung von Phospholipase-Aktivität *in vivo*: Test mit EDTA und Actinomycin C	33
2.2.19.	Bestimmung von Phospholipase-Aktivität *in vitro*: Test mit isolierten Membranen	34
3.	ERGEBNISSE	35
3.1.	Isolierung von Lipoprotein aus E. coli Jr 5511	36
3.1.1.	Anzucht der Zellen	36
3.1.2.	Isolierung von Murein-Lipoprotein-Komplex (MMLP) und freiem Lipoprotein (FLP) aus JE 5511	36
3.1.3.	Aminosäureanalyse von Lipoprotein aus JE 5511	36
3.2.	Trypsinspaltung von JE 5511 Murein-Lipoprotein-Komplex	38
3.2.1.	Sequenz von Lipoprotein aus E. coli JE 5511	39
3.3.	Einbau von 2-^{3}H-Glycerin und ^{14}C-Acetat in Lipoprotein aus Wildtypzellen und der Mutante JE 5511	39
3.3.1.	Zusammensetzung der Phospholipide von Wildtyp und JE 5511 "lpm"	40
3.3.2.	Phospholipidgehalt von "lpm"-Zellen	41
3.3.3.	Spezifische Markierung von Phospholipiden mit ^{14}C-Acetat und 2-^{3}H-Glycerin	42
3.3.4.	Radioaktive Markierung des Lipidteils von Lipoprotein aus JE 5511 "lpm" und JE 5501 WT	43
3.3.5.	Nachweis von Glycerylcystein im Lipoprotein aus JE 5511 "lpm"	44
3.4.	Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuren von Lipoprotein aus Wildtyp- und JE 5511 "lpm"-Zellen	46
3.5.	Infrarotspektroskopie	48

3.6.	Zusammenfassung: Eigenschaften von Lipoprotein aus E. coli JE 5511 "lpm"	49
3.7.	Konformationsuntersuchungen	49
3.7.1.	Infrarotspektroskopische Konformationsuntersuchungen	51
3.7.2.	Circulardichroismusmessungen	53
3.7.2.1.	Verhalten von Murein-Lipoprotein in Natriumdodecylsulfat-Lösungen	53
3.7.2.2.	Denaturierung von Murein-Lipoprotein und NaDS-Micellenbildung	54
3.7.2.3.	Denaturierung von Murein-Lipoprotein in NaDS-Lösung, ein kooperativer Prozeß	56
3.7.2.4.	CD-Konformationsuntersuchungen mit freiem Lipoprotein: Konformation von freiem Lipoprotein aus Wildtyp und "lpm"-Mutante in Puffer- und Detergenslösungen	57
3.7.2.5.	Konformationsänderung von Lipoprotein durch Einwirken zweiwertiger Ionen	59
3.7.2.6.	Konformationsänderungen von freiem Lipoprotein und Micellenbildung in Natriumdodecylsulfat-Lösungen	60
3.7.2.7.	Verhalten von freiem Lipoprotein aus Wildtyp und "lpm"-Mutante in Natriumdesoxycholatlösung	61
3.8.	Genetische Untersuchungen mit Lipoproteinmutanten	63
3.8.1.	Lipoprotein aus einem merodiploiden Stamm JE 5549 "lpm" recA F' "lpm"$^+$	63
3.8.2.	Kartierung des mutierten Gens, das den modifizierten Lipidteil von Lipoprotein (lpm-Phänotyp) bewirkt: Versuche zur Charakterisierung des lpm-Phänotyps	66
3.8.2.1.	Versuche mit Trypsin	66
3.8.2.2.	Optischer Test: Sphäroplastenbildung mit EDTA/Lysozym	66
3.8.2.3.	Korrelation von optischem EDTA/Lysozymtest mit der lpm-Eigenschaft: Untersuchungen an P 1-Transduktanten	68
3.8.2.4.	Korrelation von optischem Test mit EDTA/Lysozym mit der lpm-Eigenschaft: Fettsäurebestimmungen	69
3.8.2.5.	Versuch zur Isolierung von Lipoprotein-Fettsäuremutanten durch Anreicherung mit EDTA/Lysozymbehandlung	74

3.8.2.6.	Einbau von ^{14}C-Acetat in Lipide von lpm-Zellen	74
3.8.2.7.	Phagensensitivität von lpm-Zellen	75
3.8.2.8.	Globomycinempfindlichkeit von lpm-Zellen	77
3.8.2.9.	Verhalten von lpm-Zellen bei Behandlung mit Colicin M	79
3.8.3.	Kartierung des mutierten Gens, das dem modifizierten Lipidteil von Lipoprotein (lpm-Phänotyp) bewirkt: Rekombinanten aus JE 5504 lpm und LC 102	80
3.8.3.1.	Phospholipaseaktivität in ganzen Zellen: Test mit EDTA und Actinomycin	82
3.8.3.2.	Korrelation von Globomycin-Resistenz und EDTA/Actinomycin-Resistenz	82
3.8.3.3.	Korrelation von Globomycin-Resistenz und Fettsäurezahl am Lipoprotein (lpm-Phänotyp)	84
3.8.3.4.	Unterscheidung männlicher und weiblicher Rekombinanten durch Bestimmung der Sensitivität gegen T_7-Phagen	84
3.8.3.5.	purE-Genbereich von JE 5504 in den Rekombinanten: Hfr-Origin?	85
3.8.3.6.	Optischer Test mit EDTA und Lysozym	86
3.8.3.7.	Wirkung von Spermidin auf Sphäroplastenbildung bei WT-Zellen und EDTA/Lysozym-resistenten Zellen	86
3.8.3.8.	Ist für die Ausprägung des lpm-Phänotyps das Zusammenwirken zweier mutierter Gene erforderlich?	87
3.8.3.9.	Infektion mit T_2-Phagen	89
3.8.3.10.	Acetateinbau in Phospholipide	89
3.8.3.11.	Zusammenfassung	90
3.9.	Biochemische Untersuchungen an lpm-Mutanten	91
3.9.1.	Trennung von äußerer Membran und Cytoplasmamembran der Stämme JE 5501 und JE 5504 nach der Methode von OSBORN	91
3.9.1.1.	Verteilung der ^{14}C-Radioaktivität in den einzelnen Membranen	92
3.9.1.2.	Proteine von äußerer Membran und Cytoplasmamembran aus lpm-Mutante und Wildtypzellen	93
3.9.1.3.	Lipopolysaccharidbestimmung	93
3.9.1.4.	Zusammenfassung	94

3.9.2.	CMP-Transport bei Wildtyp JE 5501, lpm-Mutante JE 5504 und Kontrollstämmen	95
3.9.3.	Untersuchungen zur Biochemie des EDTA/Lysozymtestes	97
3.9.3.1.	Freisetzung von Lipiden in das Medium während Zellwachstum und bei EDTA/Lysozymbehandlung	98
3.9.3.2.	Abbau von Lipiden während der Inkubation von Sphäroplasten aus Wildtyp- und lpm- und pldA-Mutantenzellen bei 37° C	100
3.9.3.3.	Zusammenfassung	104
3.9.4.	Bestimmung von Phospholipase A_1-Aktivität in Membranen von Wildtypzellen und lpm-Mutante	104
4.	DISKUSSION	106
5.	ZUSAMMENFASSUNG	117
6.	LITERATURVERZEICHNIS	119

ABKÜRZUNGEN

A	Ampère
bidest.	doppelt destilliert
CD	Circulardichroismus
CMP	Cytidinmonophosphat
cmc	kritische micellare Konzentration
Col	Colicin
deion.	deionisiert
denat.	denaturiert
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraacetat, Na-Salz
FLP	freies Lipoprotein
FS	freie Fettsäuren
g	Erdbeschleunigung
IR	Infrarot
KDO	2-Oxo-3-desoxyoctonsäure
LP I	Murein-Lipoprotein (Lysozym)
LP II	Murein-Lipoprotein (Trypsin)
MMLP	Murein-Lipoprotein-Komplex
Min.	Minuten
NaDS	Natriumdodecylsulfat
n.b.	nicht bestimmt
OD_x	optische Dichte bei x nm
PEA	Phosphatidyläthanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
Proz.	Prozent
proz.	prozentig
Std.	Stunde(n)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Vit.	Vitamin

1. EINLEITUNG

Bakterien sind als einzellige Lebewesen in ihrer natürlichen Umgebung einer Vielzahl von Umwelteinflüssen ausgesetzt, die physikalischer, chemischer und biologischer Natur sein können. Da Bakterienzellen von einer empfindlichen Cytoplasmamembran umgeben sind, die die Systeme für aktiven Transport, oxidative Phosphorylierung und für die Biosynthese bestimmter Moleküle besitzt, haben sich zum Schutz dieser Membran bei verschiedenen Bakterien unterschiedliche Zellwandsysteme entwickelt.

Dünnschnitte von gram-positiven Bakterien zeigen im Elektronenmikroskop eine gut abgegrenzte, gleichmäßig dicke (15 - 30 nm) Schicht von Murein und eine darunterliegende Cytoplasmamembran, die die Zelle umschließt (94). Ein komplexeres Bild wird bei gram-negativen Bakterien gefunden (33): Die elektronendichte Mureinschicht (113) ist beträchtlich dünner (1 - 2 nm) als bei gram-positiven Bakterien und liegt zwischen der innenliegenden Cytoplasmamembran und einer zusätzlichen äußeren Membran.

Die Aufgabe des bakteriellen Mureins, eines ein- oder mehrschichtigen Makromoleküls aus Zuckerketten mit Peptidquervernetzungen, besteht darin, den wegen des hohen Konzentrationsgradienten zwischen Innenseite und Außenseite der Cytoplasmamembran auftretenden osmotischen Druck auf diese Membran abzufangen. Die Zelle wird dadurch versteift und erhält die für die jeweilige Art charakteristische Form. Bei gram-positiven Bakterien wird diese Aufgabe allein durch eine aus mehrschichtigem Murein bestehende Zellwand erfüllt, die über Lipoteichonsäuren mit der Cytoplasmamembran verknüpft ist, kovalent gebundene Teichonsäuren und Teichuronsäuren (anionische Polysaccharide) und nur sehr wenige Proteine enthält (6).

Im Gegensatz zu gram-positiven Bakterien haben alle gram-negativen Bakterien eine Mureinhülle entwickelt, von der man annimmt, daß sie einschichtig ist (32). Die äußere Membran - über kovalent gebundenes Lipoprotein (10) mit dem

Murein verbunden - bietet den gram-negativen Zellen nicht nur den Vorteil einer zusätzlichen Permeationsbarriere, sondern verstärkt die mechanische Stabilität der gesamten Zellwand und bietet einen zusätzlichen Schutz gegen osmotische Veränderungen in der Umgebung.
Morphologisch ist die äußere Membran ähnlich aufgebaut wie die Cytoplasmamembran. Sie enthält aber weniger Phospholipide, einige Proteine und eine für sie spezifische weitere Komponente: das Lipopolysaccharid. Stabilisiert wird das gesamte System durch zweiwertige Ionen, besonders Magnesium.
Die äußere Membran der gram-negativen Bakterien kann als Zellorganelle betrachtet werden, über die die Zelle mit ihrer Umwelt in selektiven Kontakt treten kann (11, 87). Dabei wird der Durchtritt von hydrophoben Molekülen durch die hydrophilen Zuckerketten der Lipopolysaccharidmoleküle erschwert oder verhindert. Die Lipidschicht der Membran bildet potentiell eine Permeationsbarriere für hydrophile Moleküle. Die äußere Membran ermöglicht es der Bakterienzelle, lytische Enzyme zum Abbau von kleinen organischen Komponenten oder Makromolekülen vom Cytoplasma getrennt innerhalb der Zelle in hoher Konzentration aufzubewahren, ohne daß die Gefahr der Selbstverdauung besteht.
Nicht verhindert werden durch diese Barriere soll die Aufnahme einer Reihe von lebenswichtigen Stoffen. So wirkt die äußere Membran als ein Molekularsieb mit einer Ausschlußgrenze von 600 - 700 Dalton für Saccharide und Oligopeptide (72). Dieser hohe Grad der Durchlässigkeit wird durch die Proteine der äußeren Membran und durch Lipopolysaccharid ermöglicht (87). In der äußeren Membran sind mindestens vier Hauptproteine in über 100 000 Kopien pro Zelle enthalten (44, 97). Für eines dieser Hauptproteine, das Matrixprotein (88), konnte gezeigt werden, daß dieses Kanäle oder Poren bildet, die die Diffusion kleiner hydrophiler Substanzen wie Aminosäuren, Zucker oder anorganischer Ionen durch die äußere Membran ermöglichen (88). Ein weiteres, induzierbares Protein der äußeren Membran - der Rezeptor für den Bakteriophagen Lambda - bildet eine Pore,

die den Durchtritt von Maltodextrinen und Maltose bei niedriger Konzentration im Medium erleichtert (107, 108). Für Substrate mit einem Molekulargewicht, das über der Ausschlußgrenze der äußeren Membran liegt, besitzen die Zellen ein eigenes Rezeptorprotein, das den Durchtritt durch die äußere Membran ermöglicht (17).

Pathogene gram-negative Bakterien z.B. müssen mit dem Eisenaufnahmesystem der Wirtszellen in Konkurrenz treten und scheiden deshalb hochaffine Komplexbildner wie Ferrichrom oder Enterochelin aus, die dreiwertiges Eisen aus der Umgebung aufnehmen. Die Größe dieser Komplexe liegt über der Ausschlußgrenze der Membran. Bei E. coli ermöglichen zwei Rezeptorproteine - das feuB-Protein und das tonA-Protein - den Durchtritt dieser Eisenkomplexe durch die äußere Membran (36, 40).

Diese drei Beispiele zeigen, daß die äußere Membran von gram-negativen Enterobakterien nicht als ein Sieb betrachtet werden darf, das großen Molekülen den Durchtritt verwehrt, sondern eine Organelle mit vielen mehr oder weniger spezifischen Poren und hochaffinen Aufnahmesystemen darstellt, die das Überleben dieser Bakterien in Konkurrenz mit dem Wirt sicherstellt.

Ein Hauptprotein der äußeren Membran von E. coli, das ompA-Protein, spielt eine wichtige Rolle bei der Konjugation der Bakterienzellen (101). Außerdem können viele Proteine der äußeren Membran und auch Lipopolysaccharidmoleküle als Rezeptoren für Bakterienviren fungieren (17). Bei der Konjugation und der Infektion mit Bakteriophagen kommt es zu einem gerichteten Transfer von DNS in eine Bakterienzelle. Über die äußere Membran wird die Wechselwirkung mit Bakterien "anderen Geschlechts" oder mit (transduzierenden) Phagen eingeleitet und damit ein Informationsaustausch zwischen verschiedenen Zellen möglich gemacht.

Am Beispiel der lytischen Phagen T_1 und T_5, die das tonA-Protein als Rezeptor benützen, um ihre DNS durch die äußere Membran in die Zelle transportieren zu können, kann gezeigt werden, daß solche Aufnahmesysteme auch mißbraucht werden können. Auch große Proteine wie Colicine (Colicin M) und

Antibiotika (Albomycin) können auf diesem Weg in das Bakterium eindringen und die Zelle töten (15, 17).
Mit diesem nur exemplarischen Abriß über Bau und Funktion der äußeren Membran von E. coli sollte das Interesse begründet werden, das die Beschäftigung mit dieser Membran und ihren Bausteinen heute findet. Sie bietet ein gut zugängliches System aus leicht zu isolierenden Komponenten - deren Bau und Struktur teilweise gut bekannt sind - das durch genetische Methoden gezielt beeinflußt werden kann und an dem als Modell viele fundamentale, nicht nur Prokarionten betreffende Fragen über Biomembranen, Biosynthese, Struktur und Funktion von Membranproteinen, Translokation von Proteinen durch Membranen, Funktion von Membranporen und Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten untereinander untersucht werden können. Genaue Kenntnis der Aufnahmewege für verschiedene Substrate ermöglicht im übrigen eine bessere Bekämpfung von pathogenen Keimen, da modifizierte Antibiotica über die natürlichen Aufnahmesysteme in die Bakterienzelle geschleust werden können.

Das Lipoprotein ist sowohl das in E. coli am häufigsten vorkommende Protein als auch eine Komponente der äußeren Membran (10, 16, 87). Es wurde in der mureingebundenen Form 1969 von V. BRAUN beschrieben (19). Pro Zelle sind 250 000 Lipoproteinmoleküle über ihre C-terminale Aminosäure, Lysin, an etwa jeden zehnten Diaminopimelinsäurerest des Mureins kovalent gebunden (12). Neben dem mureingebundenen Lipoprotein enthält die Zellhülle von E. coli die doppelte Menge an freiem Lipoprotein (51). Aus immunologischen und radiochemischen Versuchen (9, 20) ist bekannt, daß Lipoprotein ausschließlich in der äußeren Membran von E. coli, Serratia, Salmonella, Shigella und in stärker modifizierter Form auch in Proteus und Pseudomonas vorkommt (34, 66).
Die Primärstruktur des E. coli Lipoproteins wurde von V. BOSCH und V. BRAUN ermittelt, K. HANTKE klärte die Struktur des Lipidteils dieses Proteins auf (13, 39). Spektroskopische Untersuchungen zeigen, daß Lipoprotein einen hohen Prozentsatz an α-helicaler Struktur aufweist (21).

Am Beispiel von Lipoprotein lassen sich viele Fragen über Biosynthese und Funktion von Membranproteinen untersuchen. Ähnlich wie Insulin wird Lipoprotein als Propeptid durch die Cytoplasmamembran geschleust (35). Danach wird ein 20 Aminosäuren umfassendes Peptid enzymatisch abgespalten und der Lipidteil an das Protein gebunden (25). Eine weitere Reaktion ist notwendig, um freies Lipoprotein kovalent an Murein zu binden (24).

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die in (91) begonnenen spektroskopischen Untersuchungen über die räumliche Struktur des Lipoproteins fortzuführen. Weiterhin sollte Lipoprotein aus einer Lipoproteinmutante (106) isoliert und in seiner Struktur mit dem Wildtypprotein verglichen werden.
Da sich bei der Charakterisierung des Mutanten-Lipoproteins zeigte, daß dieses einen unvollständigen Lipidteil enthält, wurde außerdem versucht, Schritte in der Biosynthese des Lipidteils von E. coli-Lipoprotein aufzuklären.

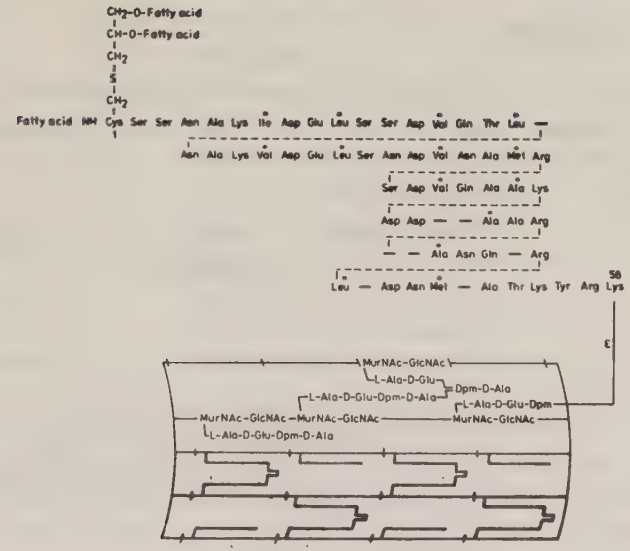


Abbildung 1: Chemische Struktur der gebundenen Form von E. coli-Lipoprotein (10). Die Amino-terminale Aminosäure ist Glycerylcystein (S-(Propan-2', 3'-diol)-3-thioaminopropionsäure), an der zwei Fettsäuren als Ester und eine Fettsäure als Amid an die endständige Aminogruppe gebunden sind (39).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von der Firma E. Merck AG., Darmstadt, bezogen.

Amersham:	1-^{14}C-Acetat
	2-^{3}H-Glycerin
	5'-^{3}H-Cytidin-5'-monophosphat
	^{35}S-NaDS
	L-^{3}H-Prolin
	L-^{3}H-Phenylalanin
Beckman:	Eichstandard zur Aminosäureanalyse
	Stand In-Auftragspuffer pH 2,2 mit Norleucin und α-Amino-β-guanidinopropionsäure (120 nM/ml)
Boehringer:	Desoxyribonuclease
	Ribonuclease
	Lysozym aus Hühnereiweiß
Difco:	Bacto-Agar
	Bacto-Trypton
	Penassay-Broth
	Yeast-Extract
	MacConkey Agar-Base
Merck-Schuchard:	N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid
	Diäthylenglykolmonoäthyläther
Pharmacia:	Sephadex G 75
	Dextranblau
Roth:	Rotiszint 11
Schleicher & Schüll:	Membranfilter BA 85 0,45 µm

Serva:	Acrylamid
	Bisacrylamid
	Ammoniumpersulfat
	N,N,N',N'-Tetraäthylendiamin (TEMED)
	Bromphenolblau
	Coomassie Brilliant Blau G 250
	Actinomycin C
	NaDS
	Pronase P aus Streptomyces griseus
	Standardgemisch mit Fettsäuremethylestern K 102 und L 206
Sigma:	Rinderserumalbumin
	Trypsin
Whatman:	GF/C-Glasfilter
Zinsser:	Quickszint 402

Colicin M wurde von R. DREHER und K. SCHALLER, Institut für Mikrobiologie II, Universität Tübingen, isoliert. Globomycin wurde von Y. HIROTA, National Institute of Genetics, Misima, Japan, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.2. Nährmedien

TY-Medium

Bacto-Tryptone	8 g
Yeast-Extract	5 g
NaCl	5 g

Mit deion. Wasser auf 1 l aufgefüllt.

M 9-Minimalmedium

a) Grundvorschrift:

Na_2HPO_4 X 2 H_2O	7,5 g
KH_2PO_4	3,0 g
NaCl	0,5 g
NH_4Cl	1,0 g
D(+) Glucose	4,0 g

$MgSO_4 \times 7\ H_2O$ 0,25 g
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$ 0,015 g
mit deion. Wasser auf 1 l aufgefüllt.
Glucose, $MgSO_4$ und $CaCl_2$ wurden getrennt autoklaviert.

b) M 9-Puffer:
Entspricht dem M 9-Medium ohne Glucose.

c) 2-^{3}H-Glycerin-Einbaumedium:
Anstelle von D(+) Glucose wurden 1,25 mCi 2-^{3}H-Glycerin in 2,0 g kaltem Glycerin pro Liter Medium als C-Quelle zugegeben.

d) ^{14}C-Acetat-Einbaumedium:
Zusätzlich zum Grundrezept waren im Acetat-Einbaumedium 0,875 g Penassay-Broth pro Liter Medium und die bei den jeweiligen Versuchen angegebene Menge an ^{14}C-Acetat enthalten.

e) Supplementierung von M 9-Medium:
Bei Auxotrophie für aromatische Aminosäuren wurden pro Liter Medium je 20 ml einer Stammlösung (1 mg/ml) von Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin und 20 ml einer Stammlösung (2 mM) von Paraminobenzoesäure und Parahydroxybenzoesäure zugegeben. Bei Auxotrophie für alle übrigen Aminosäuren (und Thiamin) wurden 20 mg der entsprechenden Aminosäuren (Vit. B_1-Hydrochlorid) pro Liter Medium, bei Auxotrophie für Purine 50 mg Adenin pro Liter Medium zugesetzt.

M 3-Medium

17,5 g Penassay-Broth wurden in einem Liter deion. Wasser gelöst.
Zur Verfestigung der Nährmedien wurde diesen 15 g Bacto-Agar pro Liter zugegeben.
Oberschicht-Agar bestand aus TY-Medium mit 6,5 g Bacto-Agar pro Liter.
Die Medien wurden 20 Min. bei 120° C in einem Autoklaven (INS 9-6-9 Münchner Medizin Mechanik) sterilisiert oder in kleinen Mengen mit einem Membranfilter steril filtriert.

2.1.3. Bakterienstämme und Bakteriophagen

2.1.3.1. Bakterienstämme aus der Stammsammlung Mikrobiologie II, Tübingen

E. coli B		(2)*		aus Weidel-Sammlung
E. coli K 12	AB 2847	(86)	aroB thi λ^r $T6^r$	
	W 3110	(16)	λ^{lys}	
	HfrH	(107)		von W. BUSCH, Inst. f. Biologie II, Lehrbereich Genetik
	Kl 14	(110)	Hfr thi rel1	B. LOW über U. HENNING, Max Planck Inst. f. Genetik
	Kl 228	(109)	Hfr leu lac thi	U. HENNING
	W 72-6	(395)	HfrC tonA malT phoA glpR glpT thi	W. BOOS über J. HÖLTJE, Max Planck Inst. f. Virusforschung
	Cl 139	(316)	thi Col M und Col B Produzent	S. GUTERMAN über K. SCHALLER Inst. f. Mikrobiol. II, Tüb.
	H 306	(311)	$T2h^r$	
	S 15	(324)	leu thi lac mal λ^r	S. NOJIMA über P. op den KAMP
	S 17	(322)	thr leu lac λ^r str mal pldA thi	

* ( ) gibt die Nummer des jeweiligen Stammes in der Stammsammlung an.

2.1.3.2. Bakterienstämme von Yukinori HIROTA, National Institute of Genetics, Misima, Japan

E. coli K 12	K 63	F^+	man his fadD gal str
	JE 5500	F^-	lpp his thi argE lacY galK mtl xyl tsx
	JE 5501	F^+	man aroD pps gal str
	W 2252	HfrC	metB
	JE 5504	HfrC	man aroD pps lpm
	JE 5503	HfrC	uidA pps lpm
	JE 5511	HfrC	man lpp pps lpm
	JE 5525	F^-	recA1 man lpp pps trp gal str
	JE 5551	F^-	man lpp pps trp gal str lpm
	JE 5549		recA1 man lpp pps trp gal str
		F'	man^+ lpp^+ $aroD^+$ pps^+
	LC 102	F^-	purE tsx proC lacY ara thi metA/B ile mtl xyl str argG his trp gal leu

Merkmale von Rekombinanten aus JE 5504 und LC 102:

aa 28	gal trp his lpm
aa 4	lacY proC gal trp his
aa 26	ara leu proC gal trp his lpm
aa 35	ara leu lacY proC his met lpm
aa 19	ara leu lacY proC purE gal trp his xyl ile met
aa 39	ara leu lacY proC purE gal trp his str xyl ile met
aa 47	ara leu proC gal trp str xyl met lpm
gs 11	aroD argG str met
gs 48	aroD his argG str
gs 4	his argG str xyl ile met
gs 43	ara leu trp his argG str xyl ile met

2.1.3.3. Stämme mit P 1-transduziertem lpp-Genbereich (106)

Typ der Transduktante	Nummer der Transduktante	Genotyp der Transduktante					Elternstämme der Transduktante		selektioniert nach
		man	uidA	lpp	aroD	pps	Donor (lpp)	Rezipient	
I	JE 5529	I	I	I	I	I	JE 5500	JE 5501	man$^+$
	JE 5530	I	I	I	I	I	JE 5500	JE 5501	pps$^+$
II	JE 5531	I	I	I	I	O	JE 5500	JE 5501	man$^+$
	JE 5532	I	I	I	I	O	JE 5500	JE 5501	aroD$^+$
III	JE 5533	O	I	I	I	I	JE 5502	JE 5503	uidA$^+$
	JE 5534	O	I	I	I	I	JE 5502	JE 5503	uidA$^+$
IV	JE 5502	O	I	I	I	I	JE 5500	JE 5501	pps$^+$
	JE 5536	O	O	O	I	I	JE 5500	JE 5501	aroD$^+$
V	JE 5542	I	I	O	O	O	JE 5502	JE 5503	uidA$^+$
	JE 5543	I	I	O	O	O	JE 5502	JE 5503	uidA$^+$
VI	JE 5511	O	I	I	I	O	JE 5500	JE 5504	aroD$^+$
	JE 5537	O	O	O	I	O	JE 5500	JE 5504	aroD$^+$
VII	JE 5544	O	I	O	O	O	JE 5502	JE 5503	uidA$^+$
	JE 5545	O	I	O	O	O	JE 5502	JE 5503	uidA$^+$
VIII	JE 5540	I		O	O	O	JE 5500	JE 5501	man$^+$
	JE 5541	I		O	O	O	JE 5500	JE 5501	man$^+$
IX	JE 5538	I		I			JE 5500	K 63	man$^+$
X	JE 5546	O	O	O	O	I	JE 5500	JE 5501	pps$^+$

I: Donor Allel; O: Rezipienten Allel. Merkmale der Donor- und Rezipientenstämme sind in der Tabelle auf der vorigen Seite aufgeführt.

2.1.3.4. Bakteriophagen

Die Bakteriophagen T_1, T_2, T_4, T_5, Ø 80 und T_7 wurden von Herrn HANTKE zur Verfügung gestellt. Sie stammten aus der Sammlung des Instituts für Mikrobiologie II.

2.2. Methoden

2.2.1. Anzucht der Bakterien

Einzelkolonien der verwendeten Bakterienstämme wurden zur Anzucht auf die in den Versuchen verwendeten Medien überimpft und bei 37° C unter guter Belüftung geschüttelt. Diese Kulturen, die als Vorkulturen zu den Versuchen dienten, wurden auf Testplatten auf ihre genetischen Merkmale überprüft.
Das Wachstum der Bakterien wurde durch Messen der optischen Dichte bei 578 nm (OD_{578}) mit einem Eppendorf-Photometer verfolgt; dabei entspricht eine OD_{578} von 0,1 einer Bakteriendichte von 10^8 Zellen pro ml Medium.
Die Bakterien wurden in folgenden Geräten gezüchtet: Gyrotory Waterbath Shaker Model G 76, New Brunswick Scientific; Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific; 10 l Fermenter Model MF 14, New Brunswick Scientific; 200 l Fermenter der Firma Giovanola, Schweiz.
Das Volumen der stationären Animpflösung betrug im allgemeinen 1 Proz. des Endvolumens; bei 200 l Fermentationen wurde mit 2 Proz. des Endvolumens angeimpft.
Bakterien aus Fermentern wurden mit einem Westphalia Separator abgeerntet; Bakterien aus Kulturen mit geringerem Volumen wurden bei 5000 g aus dem Medium abzentrifugiert und gewaschen.

2.2.2. Isolierung von Murein-Lipoprotein-Komplex (MMLP)

12 g E. coli Zellen wurden aus einem Fermenter, den man bei einer OD_{578} von 0,8 abgeerntet hatte, in 23 ml deion. Wasser im Eisbad resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit je 1 mg Desoxyribonuclease und Ribonuclease versetzt und mit 60 g Glasperlen Ø 0,17 - 0,18 mm unter Eiskühlung so lange geschüttelt (5000 - 6000 Schwingungen pro Min.), bis im Blickfeld eines Zeiss Phasenkontrastmikroskops bei 640facher Vergrößerung noch ca. 50 bis 100 intakte Zellen zu sehen waren (wurde zu lange geschüttelt, sah man keine ganzen Zellen mehr und die Ausbeute verringerte sich drastisch). Je nach verwendetem Bakterienstamm mußte zwischen 4 und 12 Min. geschüttelt werden.
Mit einer Filternutsche G 2 wurden die Glasperlen von der Suspension abgetrennt. Filtrat und Waschwasser (60 ml) wurden mit 6,6 ml 0,1 M EDTA pH 8 gemischt und 1,5 Stunden bei 18 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit den abzentrifugierten Zellwänden mit Ultraschall in 40 ml Wasser resuspendiert und eine Stunde bei 18 000 g zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser und erneutem Resuspendieren in ca. 15 ml Wasser wurden die Zellwände langsam (1 Tropfen in 3 Sekunden) mit einer Pasteurpipette in 200 ml siedende 4 proz. NaDS-Lösung getropft. Die abgekühlte Lösung wurde bei Raumtemperatur 1 Stunde bei 40 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Isolierung von freiem Lipoprotein aufbewahrt, das klare Sediment in 40 ml Wasser resuspendiert und zum Abtrennen von groben Verunreinigungen 15 Min. bei 5000 g zentrifugiert. Murein-Lipoprotein-Komplex aus dem Überstand wurde 1 Stunde bei 40 000 g abzentrifugiert. Das klare Sediment wurde in wenig Wasser resuspendiert und sofort einem enzymatischen Abbau unterworfen oder eingefroren und lyophilisiert.
Ausbeute: ca. 40 mg Murein-Lipoprotein-Komplex.

2.2.3. Isolierung von Murein-Lipoprotein (LP I)

Das Murein im Murein-Lipoprotein-Komplex wurde mit Lysozym abgebaut. Freigesetztes Lipoprotein, an dem 2 oder 3 Murein-Untereinheiten gebunden bleiben, wurde über eine Sephadex G 75-Säule gereinigt, wie in (23) beschrieben.

2.2.4. Isolierung von Lipoprotein mit Trypsin (LP II)

Lipoprotein wurde mit Trypsin vom Murein freigesetzt. Dabei wird die Polypeptidkette von Lipoprotein am C-terminalen Ende zwischen Lysin in Position 55 und Tyrosin in Position 56 gespalten. Die C-terminalen Aminosäuren Tyrosin, Arginin und Lysin bleiben am Murein gebunden. Die einzelnen Schritte, nach denen die Aufarbeitung erfolgte, sind in (21) beschrieben.

2.2.5. Isolierung von freiem Lipoprotein (FLP) (55)

Um die freie Form des Lipoproteins zu isolieren, wurde der bei der Isolierung des Murein-Lipoprotein-Komplexes anfallende 4 proz. NaDS-Überstand verwendet. Zu 200 ml dieses Überstandes wurden 50 ml 4 proz. NaDS in fünffach konzentriertem S-Puffer (S-Puffer: 0,01 M NaPhosphatpuffer pH 7,0; 0,01 M EDTA) hinzugegeben. Dieser Mischung wurden 125 ml 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,5 und 125 ml 0,02 M EDTA beigegeben und der pH-Wert auf 8,0 eingestellt; nach Zugabe von 75 ml n-Butanol wurde im Eisbad auf 4° C gekühlt. Zu der leicht trüben Mischung wurden 12,5 ml 4N Natriumacetatpuffer pH 5,5 hinzugegeben und der pH-Wert auf 5,2 eingestellt. Nach 20 Min. Inkubation in einem Eisbad wurde der entstandene Niederschlag 10 Min. bei 13 000 g abzentrifugiert und verworfen. Dem Überstand (525 ml) wurden 10 ml 1 M $MgSO_4$-Lösung und 27 ml Aceton beigegeben. Nach 20 Min. Inkubation im Eisbad wurde 10 Min. bei 13 000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und zu dem Überstand

wurden 202 ml (0,3faches Endvolumen) Aceton hinzugegeben. Die Mischung wurde 20 Min. im Eisbad inkubiert und das gefällte Protein 10 Min. bei 13 000 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 50 ml 1 proz. NaDS in S-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 50 ml 90 proz. Phenol stark geschüttelt, um das freie Lipoprotein vom Lipopolysaccharid zu trennen und in die Phenolphase zu extrahieren. Die Phasen wurden durch 10minütige Zentrifugation bei 13 000 g getrennt und die wässrige Phase wurde noch ein weiteres Mal mit 50 ml 90 proz. Phenol extrahiert.
Die vereinigten Phenolphasen wurden einmal mit 50 ml Wasser gewaschen und zur Phasentrennung 10 Min. bei 13 000 g zentrifugiert. Zu 110 ml Phenolphase wurden 220 ml Aceton in 220 ml Äther hinzugegeben und über Nacht stehengelassen. Am nächsten Morgen wurde der größte Teil des klaren Überstandes vorsichtig abgehebert, ohne das ausgefallene Protein aufzuwirbeln. Aus ca. 50 ml Restsuspension wurde das Protein 10 Min. bei 12 000 g sedimentiert und mit Ultraschall in 25 ml 1 proz. NaDS-Lösung gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0,25 ml 1 M $MgSO_4$-Lösung und 2,5 ml Aceton hinzugegeben.
Mußte Lipoprotein aus Mutantenstämmen isoliert werden, so wurden parallel gleiche Zellmassen von E. coli Wildtyp- und Mutantenstämmen aufgearbeitet. Bei der zweiten und dritten Acetonfraktionierung wurde zuerst Protein von Wildtypzellen nach obiger Vorschrift gefällt. Zu den entsprechenden Proteinlösungen von Mutantenstämmen wurde bei jedem Fällungsschritt vorsichtig so viel Aceton hinzugetropft, bis die dabei auftretende Trübung der von Wildtypprotein entsprach, das in demselben Schritt gefällt wurde. Auf diese Weise wurde auch bei Aufarbeitungen von Zellen mit Mutationen an verschiedenen Genorten eine Ausbeute von 4 - 5 mg reinstem freien Lipoprotein erzielt.
Gefälltes Protein wurde nach 20minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur 10 Min. bei 12 000 g abzentrifugiert und verworfen. Zu dem Überstand wurden 2,5 ml Aceton hinzugetropft. Nach weiteren 20 Min. Inkubation bei Zimmertemperatur wurde Lipoprotein 10 Min. bei 12 000 g abzentrifu-

giert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 10 ml 1 proz. NaDS-Lösung aufgenommen; dazu wurden 0,1 ml 0,1 M $MgSO_4$-Lösung und 1 ml Aceton gegeben. Nach 20minütiger Fällung bei Zimmertemperatur wurde das Präzipitat durch 10minütige Zentrifugation bei 12 000 g entfernt. Zum Überstand wurde 1 ml Aceton gegeben, um das Lipoprotein zu fällen. Protein, das nach 20 Min. bei Zimmertemperatur ausgefallen war, wurde abzentrifugiert, mit Ultraschall in 4 ml Wasser resuspendiert, eingefroren und lyophilisiert. Ausbeute: ca. 5 mg freies Lipoprotein.

2.2.6. Lipid-Extraktion von Murein-Lipoprotein-Komplex und freiem Lipoprotein (55)

Zu einem Volumen der lipidhaltigen Proteinlösung in 1 Proz. NaDS wurde ein Volumen Chloroform gegeben und zur guten Durchmischung mit dem Ultraschallstab (Branson Sonifier) kurz beschallt. Danach wurden 2,2 Volumenteile Methanol zugesetzt und erneut kurz mit dem Ultraschallstab beschallt, wodurch die zunächst zweiphasige Lösung einphasig wurde. Ausgefallenes Protein wurde nach 20 Min. Inkubation bei Raumtemperatur abzentrifugiert (10 000 g, 15 Min.). Das Sediment wurde erneut in 1 Proz. NaDS gelöst und die Chloroform/Methanol-Extraktion wiederholt.
Nach der vierten Extraktion wurde der Rückstand mit 50 Proz. Aceton aus wässriger Lösung gefällt und auf diese Weise NaDS-frei gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation des präzipitierten Proteins (s.o.) wurde dieses in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

2.2.7. Aminosäureanalysen

2.2.7.1. Probenvorbereitung: Perameisensäureoxidation (49)

2 mg FLP oder 5 mg MMLP wurden in einem Gemisch von 0,5 ml Ameisensäure und 0,1 ml Methanol im Branson Ultrasonic

Cleaner Ultraschallbad bei 4° C so lange suspendiert, bis eine völlig klare Lösung entstanden war. Diese Lösung wurde 30 Min. bei -5° C inkubiert und anschließend mit 10 ml Perameisensäurereagens gemischt. Zu dessen Herstellung wurden 0,5 ml 30 Proz. H_2O_2 in 9,5 ml 96 Proz. Ameisensäure 2 Std. bei Raumtemperatur umgesetzt und vor Zugabe der Proteinlösung 30 Min. bei -5° C inkubiert. Nach Mischen von Reagens- und Proteinlösung wurde das Reaktionsgemisch 2,5 Std. bei -5° C inkubiert.
War FLP oxidiert worden, wurde das Reaktionsgemisch in 400 ml Eiswasser geschüttet, vorsichtig am Rotationsverdampfer getrocknet, zweimal in Wasser resuspendiert, getrocknet und lyophilisiert.
MMLP wurde 1 Std. bei 40 000 g aus dem Reaktionsgemisch abzentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und lyophilisiert.

2.2.7.2. Probenvorbereitung: Hydrolyse

Aliquots von lyophilisierten Proteinproben (1 mg FLP, LP I und LP II; 3 mg MMLP) wurden in Glasampullen unter N_2 18 Std. bei 110° C in 5,7 N bidest. HCl hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde unter mäßigem Erhitzen bis zur Trockene eingeengt, der Rückstand in 3 ml Wasser aufgenommen und das Wasser unter Vakuum abgezogen.

2.2.7.3. Analysen (103)

Die Analysen wurden mit dem Beckman Unichrom Aminosäureanalysator im Zweisäulenverfahren und mit dem Biotronik Aminosäureanalysator LC 6005 auf einer Säule durchgeführt. Dazu wurde der Hydrolysat-Rückstand in 3 ml Na-Citratpuffer pH 2,2 aufgenommen und je 1 ml auf die kurze und lange Säule des Beckman Analysators oder 0,2 ml auf die Säule des Biotronik Analysators aufgetragen. Die Konzentration jeder Aminosäure der Probe wurde über den Flächenwert des ent-

sprechenden Gipfels berechnet, der von dem angeschlossenen System I Computing Integrator der Firma Spectra Physics ausgedruckt wurde. Als Referenz dienten die Ergebnisse von Testanalysen, die mit einem Standard-Aminosäuregemisch von Beckman durchgeführt wurden.
Dienten die Aminosäureanalysen zur Proteinbestimmung, so wurden vor der Hydrolyse 120 nM Norleucin und 120 nM α-Amino-β-Guanidinopropionsäure, die Bestandteile des Internen-Standard-Puffers von Beckman sind, zugegeben. Durch Vergleich mit Testanalysen wurden bei den Analysen Faktoren bestimmt, mit denen sich die ursprüngliche Konzentration des Proteins in der Probe (ohne Pipettierfehler oder Verluste) genau berechnen ließ. Außerdem konnten mit dieser Methode beim Zweisäulenverfahren die Konzentrationen von sauren und neutralen Aminosäuren zu den Konzentrationen der basischen Aminosäuren in Beziehung gesetzt werden.

2.2.8. Trypsinspaltung von Murein-Lipoprotein-Komplex (12)

Frisch isolierter, noch nicht eingefrorener oder lyophilisierter Murein-Lipoprotein-Komplex wurde in 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 8,5 suspendiert und 15 Std. bei 37° C mit Trypsin (Protein/Enzym-Verhältnis etwa 50/1) verdaut. Murein aus dieser Mischung wurde 1 Std. bei 40 000 g abzentrifugiert, einmal mit Wasser gewaschen und hydrolysiert. Am Murein gebundene Aminosäuren wurden mit dem Aminosäureanalysator bestimmt.

2.2.9. Pronasespaltung von Murein-Lipoprotein-Komplex

Zur Freisetzung von Lipopeptid wurde Murein-Lipoprotein-Komplex mit Pronase verdaut. Die Spaltung wurde durchgeführt wie in (12) beschrieben. Lipopeptid wurde durch Ansäuern des 40 000 g Überstandes ausgefällt.

2.2.10. Lipidanalytik: Quantitative Fettsäurebestimmung

2.2.10.1. Hydrolyse

Die Hydrolysen von phospholipidfreiem Lipoprotein (2.2.6.) wurden in lipidfrei gewaschenen Glasampullen durchgeführt - wie unter Aminosäurenanalysen in 2.2.7.2. beschrieben - mit folgenden Modifikationen: Vor der Inkubation bei 105° C wurden 100 nM Pentadecansäuremethylester in 10 µl n-Hexan als interner Standard mit einer Pedersen-Pipette hinzupipettiert.
Interner-Standard-Puffer von Beckman wurde nach der Hydrolyse zugegeben, nachdem das Hydrolysat in der Ampulle zweimal mit n-Hexan extrahiert worden war. Von dem extrahierten Hydrolysat wurden Aminosäureanalysen zur Proteinbestimmung angefertigt, der Petrolätherextrakt wurde zur quantitativen Fettsäurebestimmung in einen lipidfreien Spitzkolben überführt, darin unter Stickstoff getrocknet und verestert.

2.2.10.2. Veresterung der Fettsäuren

Bei ersten Bestimmungen wurden die extrahierten Fettsäuren mit N,N-Dimethylformamid-Dimethylacetal von Machery und Nagel Co. verestert. Da nicht alle Chargen dieses Reagens fettsäurefrei waren, wurde dazu übergegangen, Diazomethan zur Veresterung der Lipoproteinfettsäuren zu verwenden.

2.2.10.2.1. Herstellung einer Lösung von Diazomethan in Äther

Als Apparatur wurden vier 20 ml Reagenzgläser mit NS 14 Schliff und dazu passenden Waschflaschenaufsätzen mit Schläuchen so verbunden, daß Stickstoff durch alle in den vier Reagenzgläsern befindlichen Lösungen geblasen werden konnte. In Glas 1 wurde Stickstoff aus der Vorratsflasche durch 5 ml Äther geleitet. Glas 2 enthielt 1 g N-Methyl-N-

nitroso-p-toluolsulfonamid in 4 ml Diäthyläther und 4 ml Diäthylglykolmonoäthyläther. Glas 3 mit 5 ml Diäthyläther wurde im Eisbad gekühlt. Glas 4 enthielt 5 ml Eisessig zur Inaktivierung von nicht gelöstem Diazomethan. Vor und während der Reaktion wurde blasenweise N_2 durch die Apparatur geleitet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,3 g KOH in 0,5 ml dest. H_2O in Glas 2 gestartet. Nach 20 Min. konnte die deutlich gelb gefärbte Diazomethanlösung aus Glas 3 zur Veresterung der Fettsäuren verwendet werden. Diazomethanherstellung und Veresterung der Fettsäuren wurden unter einem gut ziehenden Abzug durchgeführt!

2.2.10.2.2. Veresterung der Fettsäuren mit Diazomethan

Zur Veresterung wurden die Fettsäuren in 0,5 ml Äther aufgenommen und so lange bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit in Äther gelöstem Diazomethan versetzt (ca. 1 ml) bis eine schwache Gelbfärbung bestehen blieb und der weitere Zusatz von Diazomethanlösung keine Stickstoffentwicklung mehr zur Folge hatte. Nach Abtreiben des Lösungsmittels unter Stickstoff wurde der Rückstand in 10 µl n-Hexan aufgenommen und 3 µl davon in den Gaschromatographen eingespritzt.
Die Ausbeute an Pentadecansäuremethylester nach Hydrolyse, Extraktion und erneuter Veresterung betrug 70 - 80 Proz. der vor der Hydrolyse eingesetzten Menge.

2.2.10.3. Gaschromatographie

Die Konzentration der Fettsäuremethylester wurde mit einem Varian Aerograph 1400 Gaschromatographen auf einer 180 cm langen Säule mit 2 mm Querschnitt bestimmt. Die Säule war mit OV 1 auf Gas Chrom Q, 100 - 120 mesh von Serva Heidelberg gefüllt und wurde bei 170° C gefahren.
Die verschiedenen Fettsäuren wurden durch Vergleich der Retentionszeiten und durch Cochromatographie mit den Serva

Standardgemischen L 206 und K 102 identifiziert. Die Gipfelflächen wurden nach zwei Methoden bestimmt: Das Produkt aus Entfernung vom Start mal Gipfelhöhe oder das Gewicht eines ausgeschnittenen Gipfels einer Fettsäure wurden mit dem mit derselben Methode bestimmten Flächenwert des Gipfels des internen Standards verglichen; so konnte die Konzentration der Fettsäure in der Probe berechnet werden. Die Konzentration von Lipoprotein wurde durch Aminosäureanalyse des Hydrolysats bestimmt und zur Summe der Konzentrationen der einzelnen Fettsäuren in Beziehung gesetzt.

2.2.10.4. Extraktion von Lipiden nach FOLCH und LEES (31)

Zellen oder Membransuspension in 0,5 ml dest. Wasser wurden mit 9,5 ml Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) nach Zugabe von 20 µl 6 N HCl gründlich vermischt. Die einphasige Mischung wurde durch Zugabe von 2 ml 0,78 Proz. (w/v) KCl-Lösung pH 3 zweiphasig gemacht. Aliquots der Unterphase, deren Volumen 6,5 ml betrug, wurden mit einer Pipette von der Oberphase getrennt und zur Bestimmung der Radioaktivität oder zur Dünnschichtchromatographie eingesetzt.

2.2.10.5. Bestimmung der Radioaktivität von extrahierten Lipiden

0,5 ml Unterphase der Folch und Lees-Extraktionsmischung oder extrahierte Fettsäuren in 0,5 ml Petroläther wurden in 5 ml Rotiszint Szintillationsflüssigkeit der Firma Roth im Betaszint-Zähler der Firma Diehl gezählt. Zur Bestimmung der Zerfälle pro Minute (dpm) wurde der Quench der Proben mit externem Standard ermittelt. Über Quenchkorrekturkurven, die für den ^{3}H- und ^{14}C-Kanal mit Quench-Standardproben erstellt wurden, konnten die Zählausbeuten für ^{3}H bzw. ^{14}C in den Proben ermittelt werden.
Bei Doppelmarkierungsexperimenten wurde die Zahl der Zerfälle in den einzelnen Kanälen nach folgenden Formeln be-

rechnet:

$$\text{dpm } {}^{14}C = \frac{\text{cpm im Kanal } {}^{14}C}{c_2}$$

wobei c_2 die Zählausbeute für ^{14}C im ^{14}C-Kanal ist.

$$\text{dpm } {}^{3}H = \frac{N_1c_2 - N_2c_1}{h_1c_1}$$

wobei N_1 cpm im ^{3}H-Kanal
N_2 cpm im ^{14}C-Kanal
c_1 Zählausbeute an ^{14}C im ^{3}H-Kanal
c_2 Zählausbeute an ^{14}C im ^{14}C-Kanal
h_1 Zählausbeute an ^{3}H im ^{3}H-Kanal sind.

Diese Bestimmungen wurden mit einem Tri-Carb-Liquid-Scintillation-Counter der Firma Packard unter Verwendung von Quench-Standardproben der Firma Amersham durchgeführt.

2.2.10.6. Trennung von extrahierten Lipiden mit Dünnschicht-Chromatographie

Extrahierte Lipide wurden im Vakuum von Unterphase befreit und in 50 µl Chloroform/Methanol 2:1 aufgenommen. Mit einer Kapillare wurde das Lipidgemisch auf eine Merck Alu DC-Kieselgelfolie ohne Indikator, Schichtdicke 0,2 mm, 20 x 20 cm, 2 cm vom unteren Rand entfernt aufgetragen. Das Chromatogramm wurde in einem Desaga Tank, gesättigt mit Laufmittel I (Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4) oder Laufmittel II (Chloroform/Methanol/Eisessig 65:25:10), über eine Laufstrecke von 12 cm entwickelt. Die Dünnschichtplatten waren vor Auftragen der Proben im selben Laufmittel vorentwickelt und 2 Std. bei Raumtemperatur getrocknet worden.
Die Komponenten des Lipidgemisches wurden durch Vergleich der mit einem Dünnschichtscanner der Firma Berthold ermittelten R_f-Werte der einzelnen Komponenten mit R_f-Werten aus der Literatur ermittelt (76, 81, 104): Laufmittel I: Phosphatidyläthanolamin 0,64; Phosphatidylglycerin 0,5; Lysophosphatidyläthanolamin 0,38; Fettsäuremethylester 0,94;

freie Fettsäuren 0,85. Laufmittel II: Phosphatidyläthanolamin 0,40; Phosphatidylglycerol 0,55; Cardiolipin 0,70; Fettsäuren 0,92.
Zur genauen Bestimmung der Menge der einzelnen Komponenten eines Lipidgemisches wurden diese mit einem Spatel aus der Platte ausgekratzt, das Kieselgel mit Chloroform/Methanol 2:1 extrahiert und die Radioaktivität im Extrakt bestimmt.

2.2.11. Spektroskopische Untersuchungen

2.2.11.1. Circulardichroismusmessungen

2.2.11.1.1. Probenvorbereitung

15 mg Lipoprotein wurden in 10 ml NaPhosphatpuffer pH 7,5 im Eisbad 10 mal 0,5 Min. beschallt mit einminütigen Pausen zum Abkühlen. Ungelöste Partikel aus dieser Lösung wurden 30 Min. bei 35 000 g abzentrifugiert. Die optische Dichte des Überstandes bei 320 nm war sehr niedrig ($A_{1\ cm}^{10\ \mu M}$ = 0,025), so daß Abweichungen der Spektren wegen Lichtstreuung (111) vernachlässigt werden konnten. Die Proteinkonzentration dieser Lipoprotein-Stammlösung wurde mit dem Aminosäureanalysator bestimmt.

2.2.11.1.2. Messung des Circulardichroismus

Die CD-Spektren wurden mindestens zweimal bei unterschiedlichen Küvettenstärken mit einem Roussel-Jouan Dichrographe CD 185 aufgenommen. Das Gerät war mit einer Epiandrosteron-Lösung in Dioxan auf deren Standard-Elliptizität Θ_{304} = 10295 Grad x cm^2/deziMol geeicht worden. Die mittlere Elliptizität eines Aminosäurerestes (mean residue ellipticity) Θ wurde unter Verwendung des mittleren Molekulargewichtes der Aminosäuren von 110 Dalton berechnet. Die Θ-Werte wurden für alle 2,5 nm im Wellenlängenbereich von 200 bis 260 nm ermittelt und gegen die Wellenlänge aufgetragen.

Der α-Helixgehalt der Proben wurde nach der isodichroitischen Methode von MYER (69) berechnet, wobei nach ROSENKRANZ und SCHOLTAN (89, 90) als Referenzsubstanzen für α-Helix poly L-Lysin bei pH 11,4, für β-Faltblattstruktur poly L-Lysin in 1 Proz. NaDS, für ungeordnete Struktur poly L-Serin in 8 M LiCl-Lösung verwendet wurden. Die Fehlergrenze dieser Methode bei der Berechnung von α-Helixgehalten liegt bei ± 2,5 Proz.

2.2.11.1.3. Bestimmung der Micellenbildung in NaDS-Lösungen (105)

Zu 1 ml NaDS-Lösung verschiedener Konzentrationen wurde 1 mg 2,4 Dimethylaminoazobenzol (Methylorange) zugegeben und gründlich auf einem Vortex-Mischer geschüttelt. Überschüssiges Dimethylaminoazobenzol wurde in 5 Min. bei 2500 Upm in einer Christ Minifuge abzentrifugiert. Gemessen wurde die optische Absorption bei 405 nm.

2.2.11.1.4. Chromatographie auf Sephadex G 75 zur Entfernung von NaDS

Eine 30 cm lange Säule mit einem Querschnitt von 1,5 cm wurde mit vorbehandeltem Sephadex G 75 gefüllt und mit 4 Säulenvolumen dest. Wasser langsam äquilibriert (80). Das Ausschlußvolumen der Säule wurde durch Chromatographie einer verdünnten Dextranblau-Lösung (Pharmacia) ermittelt. Wurde NaDS-haltige Lösung aufgetragen, so erschien das Lipoprotein wegen seiner Aggregationsneigung im Ausschlußvolumen der Säule getrennt von NaDS und Pufferionen, die wegen ihrer geringen Größe erst später eluiert wurden. Zur Bestimmung des NaDS-Gehaltes von eluiertem Lipoprotein wurde dieses gelöst in 1 Proz. NaDS + 1 µCi ^{35}S-NaDS auf die Säule aufgetragen. Die Radioaktivität in den eluierten Lipoproteinfraktionen wurde bestimmt und die so ermittelte NaDS-Menge auf die Lipoproteinkonzentration bezogen.

2.2.11.2. Infrarot-Spektroskopie (21, 78)

Infrarotspektren von Lipoproteinfilmen wurden mit einem IR-Spektrophotometer 365 der Firma Perkin Elmer aufgenommen. 300 µl einer Lipoprotein-Lösung (10 mg/ml) wurden auf einem Probenträger aus polykristallinem Germanium aufgetragen und auf einem Quecksilberbad frei über $CaCl_2$ schwimmend in einer auf 20 torr evakuierten Zentrifuge 10 Std. bei 1500 g zentrifugiert und getrocknet. Dadurch konnte ein Proteinfilm mit einheitlicher Schichtdicke auf den Probenträger aufgetragen werden. Die getrockneten Filme wurden in einem Vakuum von 10^{-5} torr gemessen, nasse Filme wurden nach Evakuieren auf 10^{-5} torr bei 90 Proz. Wasserdampfsättigung über einer Lösung von $BaCl_2$ in H_2O oder ^2H_2O gemessen.

2.2.12. Membrantrennung (77)

Die Bakterienstämme wurden in M 3-Medium bis zu einer OD_{578} von 0,5 angezüchtet. Anschließend zentrifugierte man die Zellen ab und resuspendierte sie in 0,75 M Sucrose, 10 mM Tris/HCl pH 7,8. Nach Zugabe von Lysozym (100 µg/ml) wurde 2 Min. bei 0° C inkubiert und dann 1,5 mM EDTA, pH 8 (zweifaches Volumen der Zellsuspension) zugegeben. Die Sphäroplasten wurden mit Ultraschall aufgebrochen. Die restlichen ganzen Zellen wurden bei 2000 g abzentrifugiert. Die Membransuspension wurde 1,5 Std. bei 80 000 g und 4° C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,25 M Sucrose, 3,3 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,5 resuspendiert und auf einen Sucrose-Stufengradienten geschichtet. Der Gradient enthielt 55, 50, 45, 40, 35 und 30 Proz. Sucrose in 5 mM EDTA pH 7,5. Der Gradient wurde 13 Std. bei 25 000 g und 4° C zentrifugiert. Die einzelnen Banden wurden in bidest. Wasser aufgenommen und 1 Std. bei 80 000 g abzentrifugiert. Diese gewaschenen Membranen wurden in bidest. Wasser aufgenommen und eingefroren.

2.2.13. Proteinbestimmung nach LOWRY (59)

Die Proteinkonzentration der Membransuspensionen wurde nach der Methode von LOWRY bestimmt. Als Standard diente eine Rinderserumalbuminlösung, deren Konzentration über ihren molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm in Wasser $E^{1\ \%}_{1\ cm}$ = 6,67 bestimmt wurde.

Lösung A: 2 g K-Na-Tartrat und
100 g Na_2CO_3 in 500 ml 1 N NaOH gelöst werden
auf 1 l mit bidest. Wasser aufgefüllt.

Lösung B: 2 g K-Na-Tartrat,
1 g $CuSO_4$ x 5 H_2O werden in
10 ml 1 N NaOH plus 90 ml bidest. Wasser gelöst.

Lösung C: 1 Vol.-Teil Folin Ciocalteaus Reagens und
15 Vol.-Teile bidest. Wasser werden frisch gemischt.

Zu 1 ml proteinhaltiger Probe wurde 0,9 ml Lösung A gegeben und 10 Min. bei 50° C inkubiert. Danach wurde die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt, 0,1 ml der Lösung B hinzugefügt und 10 bis 15 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurde unter kräftigem Mischen schnell 3 ml der Lösung C zugegeben und 10 Min. bei 50° C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 750 nm gemessen gegen einen Leerwert, der anstelle der Proteinlösung Wasser enthielt.

2.2.14. KDO-Bestimmung

Zur Bestimmung des Lipopolysaccharidgehalts der äußeren Membranen wurden die Proben (0,5 mg Protein/ml) in 0,016 N H_2SO_4 20 Min. lang bei 100° C hydrolysiert. Als Standard wurden Desoxyglucose-Lösungen mit den Konzentrationen von 0,5 bis 10 µg/ml verwandt. 0,25 ml der hydrolysierten Proben wurden mit dem gleichen Volumen einer HJO_4-Lösung (25 mM HJO_4 in 0,125 N H_2SO_4) versetzt. Die Oxidation wurde

nach 20 Min. mit 0,5 ml $NaAsO_2$ (2 Proz. in 0,5 N HCl) gestoppt. 2 Min. später wurden 2 ml Thiobarbitursäure (0,3 Proz. pH 2,0) dazugegeben und 10 Min. auf 100° C erhitzt. Nach Abkühlen der Proben wurde die Extinktion bei 546 nm gemessen.

2.2.15. NaDS-Polyacrylamid - Gelelektrophorese (58)

Proteine aus Membranfraktionen wurden mit diskontinuierlicher NaDS-Slab-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Dazu wurden folgende Stammlösungen vorbereitet:

Lösung A: 44,0 g Acrylamid (Serva Heidelberg)
0,8 g Bisacrylamid (Serva Heidelberg)
mit bidest. H_2O auf 100 ml aufgefüllt.

Lösung B: 30,0 g Acrylamid
0,8 g Bisacrylamid
mit bidest. H_2O auf 100 ml aufgefüllt.

Das Trenngel wurde auf folgende Weise hergestellt:
6,25 ml Lösung A
5,12 ml bidest. H_2O
12,5 ml Puffer (0,75 M Tris/HCl pH 8,8)
0,5 ml 10 Proz. (w/v) NaDS
0,63 ml Ammoniumpersulfatlösung (10 mg/ml frisch zubereitet)
wurden zusammengegossen und die Lösung entlüftet.
Danach wurde die Polymerisation durch Zugabe von 0,05 ml N,N,N',N'-Tetraäthylendiamin (Serva Heidelberg) eingeleitet.

Auf das polymerisierte Trenngel wurde das Sammelgel aufpolymerisiert, das auf folgende Weise zubereitet wurde:
2,5 ml Lösung B
9,13 ml bidest. Wasser
12,5 ml Puffer (0,25 M Tris/HCl pH 6,8)
0,25 ml 10 Proz. (w/v) NaDS
0,62 ml Ammoniumpersulfatlösung (10 mg/ml)
wurden zusammengegossen und die Lösung entlüftet. Mit 0,05 ml N,N,N',N'-Tetraäthylendiamin wurde die Polymerisation

eingeleitet. Die Gele wurden über Nacht bei 4° C gelagert und mit einer konstanten Stromstärke von 12,5 mA/cm^2 gefahren.
Als Elektrodenpuffer wurde
0,025 M Tris
0,1925 M Glycin
0,1 Proz. (w/v) NaDS verwendet.
Dieser Puffer hatte einen pH-Wert von 8,3.
Die Proteinproben wurden in folgendem Puffer aufgetragen:
0,2 ml Puffer (0,625 M Tris/HCl pH 6,8)
0,4 ml 50 Proz. Glycerin, 0,01 Proz. Bromphenolblaulösung
0,4 ml NaDS 10 Proz. (w/v)
0,1 ml Mercaptoäthanol
Zu diesem Puffer gibt man 0,9 ml der Proteinlösung. Das Gemisch wurde 3 - 5 Min. auf 100° C erhitzt.

2.2.16. Anfärben von Polyacrylamid-Gelen (30)

Die Gele wurden gefärbt und entfärbt, indem sie nacheinander für jeweils ca. 12 Std. in folgende Lösungen gelegt wurden:
Lösung 1: 10 Proz. Essigsäure
25 Proz. Isopropanol
0,03 Proz. Coomassie Brillant Blau G 250
Lösung 2: 10 Proz. Essigsäure
10 Proz. Isopropanol
0,003 Proz. Coomassie Brillant Blau
Lösung 3: 10 Proz. Essigsäure
0,001 Proz. Coomassie Brillant Blau
Lösung 4: 10 Proz. Essigsäure

2.2.17. Aufnahme von Cytidinmonophosphat (5'CMP)

Zellen wurden über Nacht in M 9-Medium gezüchtet, abzentrifugiert, gewaschen und in M 9-Medium ohne Supplement auf OD_{578} = 0,12 verdünnt, 5 Min. bei 37° C inkubiert und mit

^{3}H-CMP versetzt. Nach CMP-Zugabe wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, die Zellen daraus auf Whatman GF/C-Filtern abfiltriert und zweimal mit M 9-Puffer nachgewaschen. Die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität wurde nach Trocknen der Filter über Nacht unter Verwendung von 5 ml Rotiszint-Szintillatorflüssigkeit (Carl Roth KG.) im Szintillationszähler Mark II der Firma Nuclear Chicago gezählt.

2.2.18. Tests für genetische Untersuchungen

2.2.18.1. Phagentest: Bestimmung der "plating efficiency"

Je 10^{8} Zellen aus der mittleren logarithmischen Phase des zu untersuchenden Bakterienstammes wurden mit verschiedenen Phagenkonzentrationen in TY-Oberschicht-Agar ausplattiert. Als Kontrolle dienten Stämme, die im untersuchten Merkmal Wildtypverhalten zeigten. Nach der Inkubation über Nacht bei 37° C wurden die Lysehöfe bei Platten mit geeigneter Phagenkonzentration ausgezählt und mit der Kontrolle verglichen.

2.2.18.2. Colicin M-Tropftest

Zur Bestimmung der Colicin M Sensitivität bei ganzen Zellen wurde der zu testende Stamm wie beim Phagentest in Oberschicht-Agar ausplattiert. Auf vormarkierte Stellen wurde die Colicin M-Lösung in den Verdünnungsstufen 10^{0} bis 10^{-5} in 10 µl-Portionen aufgetropft. Nach Inkubation über Nacht bei 37° C wurden die Lysehöfe bei Wildtyp- und Mutantenstämmen verglichen. Die Verdünnungsstufe der Colicin M-Lösung, bei der Lysehöfe auf der Testplatte zu erkennen waren, gibt den Grad der Sensitivität (Toleranz) des untersuchten Stammes gegen Colicin M an. Als Kontrolle für einen funktionierenden Colicin M-Rezeptor (tonA-Protein) wurden auf jede Platte auch Ø 80- und T_5-Phagen aufgetropft.

2.2.18.3. Globomycin-Querstrichtest

0,1 ml einer Globomycinlösung (10 mg/ml) in 50 Proz. Äthanol wurden mit einer Pipette auf einer TY-Agarplatte ausgestrichen. Im rechten Winkel dazu wurden Bakterien aus einer Flüssigkeit quergestrichen und bei 37° C über Nacht inkubiert. Bestimmt wurde die Länge der Zone, in der keine Bakterien gewachsen waren.

2.2.18.4. Optischer EDTA/Lysozymtest (114)

Zellen des zu untersuchenden Stammes wurden in M 3-Medium bis zu einer OD_{578} von 0,5 gezüchtet und aus 17,5 ml dieser Kultur abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 4 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8 resuspendiert und nach Zugabe von 4 ml 1 M Sucrose in 0,2 M Tris/HCl pH 8 2 Min. bei 0° C inkubiert. Danach wurden 40 µl 0,1 M EDTA pH 7,5 und 0,5 ml einer Lysozymlösung (1 mg/ml) in 0,2 M Tris/HCl pH 8 zugemischt. Sofort nach Lysozymzugabe wurden unter Schütteln der Suspension auf einem Vortex Mischer 8,5 ml bidest. Wasser zugegeben. Nach gutem Durchmischen wurde 1 ml dieser Suspension in eine auf 37° C geheizte Küvette im automatischen Küvettenwechsler eines Eppendorf Photometers überführt und die Abnahme der optischen Dichte mit einem Registrierschreiber aufgezeichnet.
Wurden Sphäroplasten zu Lipid-Untersuchungen hergestellt, wurde die zehnfache Zellmenge von ^{14}C-Acetat-markierten Zellen in den gleichen Flüssigkeitsvolumina umgesetzt.

2.2.18.5. Kurieren von Hfr- und F^+-Zellen mit NaDS (110)

Zellen aus einer Übernacht-Vorkultur wurden in 20 ml M 3-Medium mit 17,5 Proz. (w/v) Sucrose und 0,1 Proz. NaDS zu einer Zelldichte von 10^4 Zellen/ml überimpft. Diese Kultur wurde 24 Std. ohne Schütteln bei 37° C inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine Verdünnungsreihe mit Saline

angefertigt und auf TY-Platten ausgestrichen. Überlebende Einheiten wurden gepickt und auf ihre Merkmale untersucht.

2.2.18.6. Bestimmung von Phospholipase-Aktivität *in vivo*: Test mit EDTA und Actinomycin C (41)

Phospholipase A_1-Aktivität in ganzen Zellen wurde mit EDTA und Actinomycin C bestimmt. Dabei wurde mit jedem zu untersuchenden Stamm nach folgendem Schema verfahren:
Eine 100 ml Kultur in M 3-Medium wurde mit 1 ml Übernachtkultur angeimpft und bis zu einer OD_{578} von 0,2 bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden abgeerntet und zweimal mit 0,05 M Tris/HCl pH 7,4 gewaschen. Danach wurden die Zellen in 10 ml 0,12 M Tris/HCl pH 8 resuspendiert und in 4 2 ml-Portionen aufgeteilt: Probe 1 - 4.
Die Proben 1 und 2 wurden mit je 10 µl 0,1 M EDTA versetzt und 2 Min. bei 37° C geschüttelt. Anschließend wurden die Proben 1 - 4 mit M 3-Medium auf 20 ml aufgefüllt. Zur Probe 1 und 3 wurden 0,02 ml einer Lösung von Actinomycin C (10 mg/ml) in Methanol zugegeben. Danach wurden alle Proben 30 Min. bei 37° C inkubiert. Von allen Proben wurde eine 10^{-4} und 10^{-5}-Verdünnung in Saline auf TY-Platten ausgestrichen.
Nach Inkubation über Nacht bei 37° C wurde der Versuch ausgewertet. Als Kontrolle wurden ein Stamm ohne Phospholipase A_1-Aktivität (S 17 pldA) und der isogene Wildtypstamm S 15 mit den untersuchten Stämmen verglichen. Bei Stämmen ohne Phospholipase-Aktivität wurde Wachstum auf allen 4 Platten beobachtet (Probe 1: EDTA + Actinomycin; Kontrollen: Probe 2: EDTA; Probe 3: Actinomycin; Probe 4: ohne Zusatz); bei Wildtypstämmen fanden sich keine oder nur sehr wenige Kolonien auf Platte 1, auf Platte 2, 3 und 4 dichtes Wachstum. Als weitere Kontrolle wurden die EDTA/Actinomycin-behandelten Zellen aus Probe 1 im Biophotometer inkubiert und ihr Wachstum beobachtet. pldA-Zellen wuchsen dabei nach kurzer lag-Phase (15 - 30 Min.) logarithmisch weiter, Wildtypstämme zeigten erst nach 6 - 12 Std. logarithmisches Wachstum.

2.2.19. Bestimmung von Phospholipase-Aktivität *in vitro*: Test mit isolierten Membranen (29)

Zellen wurden bei OD_{578} = 0,5 aus 100 ml Kultur in M 3-Medium abzentrifugiert, einmal mit kalter Saline gewaschen und in 8 ml 5 mM Tris/HCl pH 7,5 so lange beschallt, bis bis Suspension klar wurde. Die beschallte Suspension wurde 1,5 Std. bei 100 000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,1 ml dest. Wasser aufgenommen. Nachdem der Proteingehalt dieser Suspension bestimmt worden war, wurde so viel 5 mM Tris/HCl pH 7,5 zugegeben, daß diese als Enzym eingesetzte Lösung 4 mg/ml Protein enthielt.
Die Inkubationsmischung zum Enzymtest enthielt ^{14}C-Phosphatidyläthanolamin (ca. 10 000 cpm), das aus Zellen mit ^{14}C-Acetat-markierten Lipiden durch Dünnschichttrennung isoliert worden war, 0,05 ml 0,1 M $CaCl_2$, 0,05 ml 0,05 Proz. NaDS in 0,2 M Tris/HCl pH 8,2, 0,2 ml Enzymlösung und 1,5 ml Methanol. Dieses Gemisch wurde mit bidest. Wasser auf 3 ml aufgefüllt und bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Nach 2 Std. Inkubation wurde die Reaktionsmischung auf 0° C gekühlt. 6 ml Chloroform plus 1,5 ml Methanol wurden der Mischung zugegeben und gut gemischt. Nach 10 Min. Zentrifugation bei 2000 g hatte die Mischung sich in zwei Phasen getrennt. Die Unterphase wurde entfernt, zur Trockene eingedampft, in 0,1 ml Chloroform/Methanol 2:1 aufgenommen und auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Lipide wurden mit Laufmittel I getrennt, ausgekratzt, vom Kieselgel extrahiert und gezählt. Vor dem Auskratzen wurde die Position der Lipide auf der Platte mit dem Dünnschicht-Scanner ermittelt.

3. ERGEBNISSE

Y. HIROTA und Mitarbeiter beschreiben eine Lipoprotein-Mutante MFT 1033 (106), die sie zufällig bei der Untersuchung von Membranproteinen aus Zellteilungsmutanten (86) entdeckten. Lipoprotein aus dieser Mutante besitzt eine freie Thiolgruppe. Die Autoren vermuteten damals, daß Lipoprotein aus E. coli MFT 1033 kein thioäther-gebundenes Diglycerid besitzt. Der Genort für diese Mutation, die die Autoren vorläufig mit "lpm" (= modifiziertes Lipoprotein) bezeichneten, liegt bei 36,5 Min. auf dem E. coli-Chromosom und ist unabhängig von der ftsD-Mutation, die für das fadenförmige Wachstum der MFT 1033-Zellen verantwortlich ist. Die Isolierung und genauere Charakterisierung von Lipoprotein aus E. coli JE 5511 HfrC, man, "lpm", pps - einem Stamm, der den "lpm"-Genbereich von MFT 1033 enthält (vgl. Abb. 2) -, ist im folgenden beschrieben.

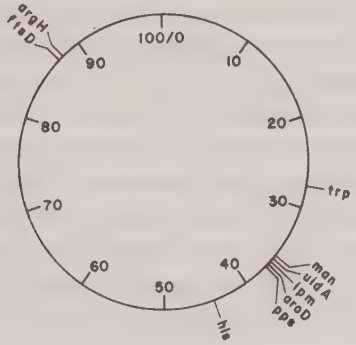


Abbildung 2: Genkarte von E. coli K 12.
Die Genorte von "lpm", ftsD und von Referenzmerkmalen sind angegeben.

3.1. Isolierung von Lipoproteinen aus E. coli JE 5511

3.1.1. Anzucht der Zellen

Nach der Bestimmung der Generationszeit von JE 5511 in M 9-Minimalmedium durch einen Biophotometerversuch (bei 37° C = 75 Min.) wurde ein 200 l-Fermenter mit 4 l einer Übernacht-Vorkultur von JE 5511 (OD_{578} = 1,7) angeimpft, bei einer OD_{578} von 0,6 mit Leitungswasser auf 15° C gekühlt und mit einem Westphalia-Separator abgeerntet. Die OD der Bakteriensuspension stieg beim Einlaufen in den Rotor des Separators während der Erntezeit von 0,75 auf 1,5. Es konnten 420 g Zellen geerntet werden.

3.1.2. Isolierung von Murein-Lipoprotein-Komplex (MMLP) und freiem Lipoprotein (FLP) aus JE 5511

Die Isolierung von Murein-Lipoprotein-Komplex erfolgte wie in (19) und in Material und Methoden unter 2.2.2. beschrieben. Als wichtig für eine gute Ausbeute an MMLP aus JE 5511 erwies sich hierbei die Kontrolle des Zellaufschlusses im Mikroskop: JE 5511-Zellen sind schon nach 4 Min. vollständig aufgeschlossen, E. coli B/r-Zellen von Merck erst nach 8 bis 9 Min. Um zu verhindern, daß sich zwischen "lpm"-Lipoprotein und anderen E. coli-Proteinen während des Kochens in Natriumdodecylsulfatlösung Disulfidbrücken bilden, wurde dieser Lösung 1 Proz. Mercaptoäthanol zugesetzt. Aus dem Natriumdodecylsulfatüberstand nach Abzentrifugieren von MMLP konnte freies Lipoprotein isoliert werden (vgl. (55) und Material und Methoden 2.2.5.).

3.1.3. Aminosäureanalyse von Lipoprotein aus JE 5511

Die Prüfung auf Reinheit der isolierten Lipoproteinproben erfolgte durch Aminosäureanalysen, deren Ergebnisse in Tabelle 1 zusammengefaßt sind. Diese Aminosäureanalysen zei-

Tabelle 1: Aminosäureanalysen von Murein-Lipoprotein-Komplex und freiem Lipoprotein aus JE 5511

Aminosäure	Freies Lipoprotein			Murein-Lipoprotein-Komplex		
	Durchschnitt der Zahl der Reste/Mol LP		Tatsächliche Zahl der Reste/Mol LP	Durchschnitt der Zahl der Reste/Mol LP		Tatsächliche Zahl der Reste/Mol LP
	oxid.	nicht oxid.		oxid.	nicht oxid.	
Cysteinsäure	1,37		1	1,24		1
Asparaginsäure	13,59		14	13,69		14
Methioninsulfon	1,86		2	1,76		2
Threonin	2,21		2	2,52		2
Serin	5,57		6	5,59		6
Glutaminsäure	5,46		5	nicht bestimmt		
Prolin	0		0	0		0
Glycin	0,34		0	0,41		0
Alanin	8,91		9	nicht bestimmt		
Valin*	4,00		4	4,00		4
Isoleucin	1,06		1	1,38		1
Leucin	3,7		4	4,44		4
Tyrosin		0,79	1		0,87	1
Phenylalanin		0,11	0		0,07	0
Lysin	5,07		5	4,89		5
Histidin	0		0	0		0
Arginin	3,32		3	3,11		3
Diaminopimelinsäure (DAP)	0		0	11,07		11

* Die Berechnung der Durchschnittswerte erfolgte auf der Basis von je zwei Analysen zweier unterschiedlicher Aufarbeitungen. Dabei wurde die Valinkonzentration in allen Analysen gleich 4,00 gesetzt und damit die Zahl der übrigen Reste bestimmt.

gen, daß nach Perameisensäureoxidation ein Gipfel in der Position von Cysteinsäure auftritt, der mehr als doppelt so hoch ist wie in der entsprechenden Analyse von Wildtyp-protein.
Außerdem enthält Lipoprotein aus JE 5511 nur drei statt vier Argininreste pro Proteinmolekül. Daraus kann die Hypothese abgeleitet werden, daß eine Punktmutation im JE 5511-Chromosom zu einem Aminosäureaustausch Arg → Cys im Lipoprotein führt (52).

3.2. Trypsinspaltung von JE 5511 Murein-Lipoprotein-Komplex

Wird MMLP aus E. coli B/r-Zellen mit Trypsin verdaut, so bleibt nur Lysin am Murein gebunden (19). Im Gegensatz dazu findet man nach der Trypsinspaltung Tyrosin, Cystein und Lysin am Murein von JE 5511.

Tabelle 2: Aminosäureanalysen von Murein-Lipoprotein-Komplex vor und nach Trypsinverdauung

Aminosäurerest	Mol/Mol Lipoprotein*	
	vor Trypsin-behandlung	nach Trypsin-behandlung
Tyrosin	0,87	1,02
Cysteinsäure	1,24	1,12
Lysin	4,89	1,26
Arginin	3,11	0,34
Asparaginsäure	13,69	1,59
Valin	4,00	0,47

* Die Berechnung der Mengen der einzelnen Aminosäuren am Murein erfolgte auf der Basis des aus Tabelle 1 entnommenen Verhältnisses Lipoprotein/DAP = 1:11,07. Die Mutante enthält die gleiche Menge von gebundenem Lipoprotein wie der Wildtyp.

Tabelle 2 zeigt, daß die Trypsinspaltung von JE 5511 MMLP zu etwa 90 Proz. vollständig ist; dies kann man an der Menge der am Murein verbliebenen, für die Tabelle als Beispiele ausgewählten übrigen Aminosäuren erkennen. Der Versuch,

aus dem Überstand der tryptischen Peptide und von Pronase-Peptiden von JE 5511 Lipoprotein zu isolieren, zeigte, daß dieses - im Gegensatz zu Wildtyplipopeptid - durch Ansäuern auf pH 3 nicht zu fällen ist.

3.2.1. Sequenz von Lipoprotein aus E. coli JE 5511

Die bekannte Sequenz von Lipoprotein (12) endet mit den Resten -Tyr-Arg-Lys, wobei das C-terminale Lysin über die ε-Aminogruppe an das Murein gebunden ist. Analog dazu besitzt das Mutantenlipoprotein die C-terminale Sequenz -Tyr-Cys-Lys.

3.3. Einbau von 2-^{3}H-Glycerin und ^{14}C-Acetat in Lipoprotein aus Wildtypzellen und der Mutante JE 5511

Nachdem der Aminosäureaustausch Arg → Cys im C-terminalen Bereich der Polypeptidkette als Ursache für die Dimerenbildung von "lpm"-Lipoprotein über Disulfidbrücken festgestellt werden konnte, sollte nun geklärt werden, ob das am N-terminalen Ende gebundene Diglycerid tatsächlich, wie von INOUYE und HIROTA beschrieben und vermutet wurde (106), im Mutantenlipoprotein fehlt. Dazu wurde der Einbau von 2-^{3}H-Glycerin und ^{14}C-Acetat in den Lipidteil von Lipoprotein gemessen. Am C-Atom 2 von Glycerin gebundenes Tritium wird spezifisch in den Glycerinteil von Phospholipiden und Lipoprotein eingebaut (39). 2-^{3}H-Glycerin, das verstoffwechselt wird, verliert dabei die Tritiummarkierung. Bietet man Bakterien ^{14}C-Acetat an, so findet sich - besonders bei kurzen Einbauzeiten - die Radioaktivität zum größten Teil in der Membranfraktion wieder. Das Acetat wird dabei vorwiegend in die Fettsäuren der Phospholipide und Lipopolysaccharide eingebaut. Auch die Fettsäuren des Lipidteils von Lipoprotein werden radioaktiv markiert. Nach längeren Einbauzeiten findet sich jedoch ein steigender Teil der ^{14}C-Aktivität auch im Bakterienprotein.

3.3.1. Zusammensetzung der Phospholipide von Wildtyp und JE 5511 "lpm"

Ein Vorversuch diente zum Vergleich des Einbaus von ^{14}C-Acetat und 2-^{3}H-Glycerin in Phospholipide aus Wildtyp- und "lpm"-Zellen. Dazu mußte zuvor die Phospholipidzusammensetzung beider Stämme verglichen werden. Die aus logarithmischen Zellen von JE 5501 "lpm^{+}" und JE 5511 "lpm" extrahierten Phospholipide und Fettsäuren (31) wurden mit dem Laufmittelsystem II auf einer Dünnschichtplatte aufgetrennt. Tabelle 3 zeigt die prozentuale Zusammensetzung der Lipide von JE 5501 und JE 5511. Prozentual vom Gesamtlipid gesehen enthalten Phospholipide aus "lpm"-Zellen ca. 10 Proz. mehr Phosphatidyläthanolamin und 50 Proz. weniger Phosphatidylglycerin als Wildtypzellphospholipide. Dies zeigt auch die folgende Abbildung 3.

Tabelle 3: Prozentuale Zusammensetzung der Chloroform/Methanol-extrahierten Lipide aus "lpm"- und Wildtypzellen

	Phosphatidyl-äthanolamin	Phosphatidyl-glycerin	Cardio-lipin	Fett-säuren
JE 5501 WT	78,8 %	14,2 %	< 1 %	6,9 %
JE 5511 "lpm"	86,7 %	7,9 %	< 1 %	4,5 %

Nach FOLCH und LEES (31) wurden die Lipide aus saurer Lösung mit Chloroform/Methanol aus ^{14}C-markierten Zellen beider Stämme extrahiert und anschließend auf einer Dünnschichtplatte mit Chloroform/Methanol/Eisessig 65/25/10 aufgetrennt. Danach konnten die radioaktiven Flecken ausgekratzt und mit Toluolscintillator gezählt werden. Die Prozentwerte stehen für Prozent der Zerfälle pro Min. einer Komponente von Gesamtzerfällen aller auf der Platte befindlichen Komponenten.

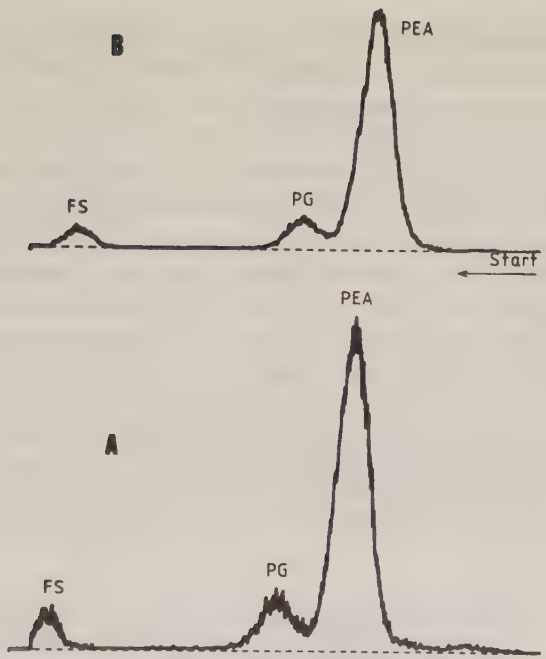


Abbildung 3: Radiochromatogramm von Lipiden aus Wildtyp- (A) und "lpm"-Zellen (B).
Die nach (31) aus Zellen beider Stämme isolierten Lipide wurden auf einer Dünnschichtplatte mit dem Laufmittel II getrennt. Die Positionen der Lipide wurden durch Aufzeichnen eines Radiochromatogramms bestimmt und die Lipide durch Vergleich der R_f-Werte der Gipfel mit der Literatur (81) identifiziert.
PEA: Phosphatidyläthanolamin; PG: Phosphatidylglycerin; FS: Fettsäuren

3.3.2. Phospholipidgehalt von "lpm"-Zellen (67)

Zur Bestimmung des Phospholipidgehalts von "lpm"- und Wildtypzellen wurden Aliquots der extrahierten Phospholipide in 5,7 N bidest. HCl 18 Std. bei 105° C hydrolysiert. Nach Extraktion der Fettsäuren mit Petroläther konnte der Äthanolamingehalt in den Hydrolysaten durch Aminosäureanalysen bestimmt werden. Umgerechnet auf identische Zellmassen (CD_{578}) ergab sich bei den Analysen ein Flächenverhältnis

von 1 (WT) : 1,23 ("lpm"). Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Phospholipidzusammensetzungen beider Stämme erhält man als korrigiertes Verhältnis 1 (WT) : 1,11 ("lpm").
"lpm"-Zellen enthalten demnach 11 Proz. mehr Phospholipide wie Wildtypzellen. Gaschromatographische Bestimmungen der Fettsäuren in den Petrolätherextrakten der zur Äthanolaminbestimmung verwendeten Hydrolysate (67) bestätigen dies: Als Mittelwert von drei Bestimmungen konnte für den Fettsäuregehalt von Phospholipiden aus JE 5501 und JE 5511 "lpm" das Verhältnis 1 (WT) : 1,14 ("lpm") berechnet werden.
Im folgenden wird somit davon ausgegangen, daß Zellen mit modifiziertem Lipoprotein ca. 14 Proz. mehr Phospholipid enthalten wie Wildtypzellen.

3.3.3. Spezifische Markierung von Phospholipiden mit ^{14}C-Acetat und 2-^{3}H-Glycerin (67)

Tabelle 4 zeigt den Einbau von 2-^{3}H-Glycerin und ^{14}C-Acetat in Phospholipide aus JE 5501 und JE 5511 "lpm". Der scheinbar um 17 Proz. erhöhte Einbau von Glycerin in "lpm"-Zellen ist zurückzuführen auf den um ca. 14 Proz. höheren Phospholipidgehalt der Zellen mit modifiziertem Lipoprotein.
Bei Berücksichtigung des Phospholipidgehalts läßt sich durch den Acetat-Einbauversuch eine um den Faktor 2,03 erhöhte spezifische Markierung der Phospholipidfettsäuren von JE 5511 "lpm" mit ^{14}C-Acetat nachweisen.
Die spezifische Markierung von Phospholipiden aus WT- und "lpm"-Zellen mit 2-^{3}H-Glycerin ist also gleich stark, die spezifische Markierung der Phosphilipidfettsäuren aus "lpm"-Zellen ist im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 2,03 erhöht.

Tabelle 4: Einbau von 2-^{3}H-Glycerin und ^{14}C-Acetat in Phospholipide aus Wildtyp- und "lpm"-Zellen

2-^{3}H-Glycerin dpm/10^{8} Zellen				^{14}C-Acetat dpm/10^{8} Zellen			
WT		"lpm"		WT		"lpm"	
OD_{578}	dpm	OD_{578}	dpm	OD_{578}	dpm	OD_{578}	dpm
0,115	2711	0,071	2749	0,28	1180	0,34	2876
0,3	3451	0,225	3633				
0,72	4587	0,8	5228	0,61	1315	0,56	2859

Mit 2,5 µCi/ml Medium 2-^{3}H-Glycerin oder 0,4 µCi/ml Medium ^{14}C-Acetat markierte Phospholipide wurden nach (31) aus den Zellen extrahiert, mit KCl gewaschen und in Toluolscintillator gezählt. Die Zahl der Zerfälle pro Min. wurde mit externem Standard und Quenchkorrekturkurven bestimmt. Die Extraktion der Lipide erfolgte aus Zellen, die bei den Zelldichten, die in der Tabelle angegeben sind, aus Glycerin- bzw. Acetat-Einbaumedien entnommen wurden.

3.3.4. Radioaktive Markierung des Lipidteils von Lipoprotein aus JE 5511 "lpm" und JE 5501 WT

Da es möglich ist, sowohl den Diglyceridteil der Phospholipide wie auch den des Lipoproteins mit 2-^{3}H-Glycerin und ^{14}C-Acetat zu markieren, wird angenommen, daß der Diglyceridteil des Lipoproteins aus dem Phospholipidstoffwechsel stammt (25, 39). Mit einem Doppelmarkierungsversuch sollte deshalb die Menge von Glycerin und Fettsäuren von "lpm"-Lipoprotein und Wildtypprotein verglichen werden können, wenn man dabei den bei Phospholipiden ermittelten Unterschied beim Einbau von ^{14}C-Acetat berücksichtigt.
Tabelle 5 zeigt, daß in Wildtyp- und in "lpm"-Lipoprotein gleiche Mengen von 2-^{3}H-Glycerin eingebaut werden. Die unter der Prämisse gleicher Markierung von Phospholipid- und Lipoproteinfettsäuren berechnete Zahl der Fettsäuren, die an "lpm"-Lipoprotein gebunden sind, liegt mit 1,6 jedoch bedeutend niedriger als bei Wildtyp-Lipoprotein.

Tabelle 5: Einbau von 2-^{3}H-Glycerin und ^{14}C-Acetat in Lipoprotein aus Wildtyp- und "lpm"-Zellen

	^{3}H dpm/nMol LP	^{14}C dpm/nMol LP	Mol Fettsre. pro Mol LP	^{14}C/^{3}H Hydro-lysat	MMLP
JE 5501	1970	1080	3	0,55	1,7
JE 5511	1900	1160	1,6	0,61	2,03

Aus Zellen, die in Glycerin-Einbaumedium mit 0,2 mCi/l Medium 2-^{3}H-Glycerin und 0,08 mCi/l Medium ^{14}C-Acetat gezüchtet wurden, wurde MMLP isoliert, delipidiert (55) und hydrolysiert. Die Tabelle zeigt die ^{3}H-Zerfälle, die in den Hydrolysaten und die ^{14}C-Zerfälle, die in Petrolätherextrakten aus den Hydrolysaten bestimmt wurden, und die über Aminosäureanalysen von Aliquots der jeweiligen Hydrolysate auf Nanomole Lipoprotein umgerechnet sind. Die Tabelle zeigt auch die Kanalverhältnisse von extrahierten ^{14}C-dpm zu ^{3}H-dpm aus dem Hydrolysat im Vergleich zu den mit nicht hydrolysierten MMLP-Proben bestimmten Kanalverhältnissen. Diese unabhängig voneinander ermittelten Werte steigen bei beiden Lipoproteinproben proportional zueinander an, was einen Fehler bei der Extraktion der Fettsäuren aus den Hydrolysaten ausschließt. Die Zahl der Fettsäuren pro Mol Lipoprotein aus JE 5511 ist unter folgenden Prämissen angegeben:
1. WT-Lipoprotein enthält 3 gleich stark markierte Fettsäuren.
2. Die am "lpm"-Lipoprotein gebundenen Fettsäuren sind ebenso wie die der Phospholipide um den Faktor 2,03 stärker markiert verglichen mit denen von Wildtyp-Lipoprotein.

3.3.5. Nachweis von Glycerylcystein im Lipoprotein aus JE 5511 "lpm"

Im Wildtyp-Lipoprotein ist Glycerin als Thioäther an den N-terminalen Cysteinrest der Polypeptidkette gebunden (37, 39). Zur Bestimmung des Ortes der Glycerinbindung im Lipoprotein aus JE 5511 wurden die Hydrolyseprodukte von 2-^{3}H-Glycerin-markiertem MMLP aus Wildtyp- und "lpm"-Zellen auf die lange Säule des Aminosäureanalysators aufgetragen. Abbildung 4 zeigt das Elutionsprofil von JE 5511 und W 3110-Hydrolysaten. Um gute Zählausbeuten zu gewährleisten, wurde das Säuleneluat vor der Reaktion mit Ninhydrin in einem Fraktionssammler aufgefangen. Die Positionen der ^{3}H-markierten Hydrolyseprodukte sind bei beiden Proben identisch. Eine Perameisensäureoxidation verschiebt die Position des

kurz vor Asparaginsäure eluierten Radioaktivitätsgipfels auf eine Position kurz hinter Cysteinsäure. Murein-Lipoprotein aus JE 5511 enthält also Glycerylcystein wie Lipoprotein aus dem Wildtypstamm W 3110. Daß die Mengen von gebundenem Glycerylcystein in beiden Stämmen etwa gleich sind, kann man an den vergleichbaren Höhen der Radioaktivitätsgipfel erkennen, die auf dieselben Proteinmengen (32 nM) bezogen sind.

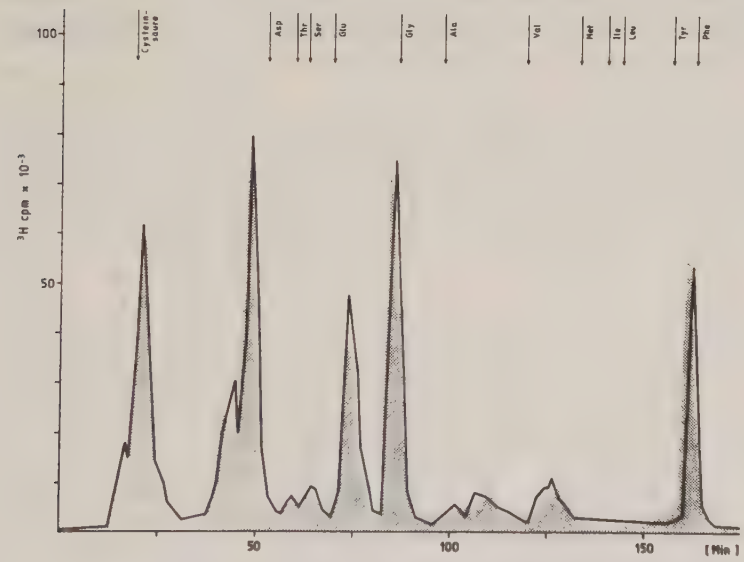


Abbildung 4: 2-^{3}H-Glycerin-markierter Murein-Lipoprotein-Komplex aus JE 5511 (____) und W 3110 (▒▒▒). MMLP aus beiden Stämmen wurde nach Hydrolyse mit 6 N HCl (18 Std. bei 110° C) auf die lange Säule des Aminosäureanalysators aufgetragen und mit Natriumcitratpuffer pH 3,25 und 4,25 in einen Fraktionssammler eluiert. Die Radioaktivität in den Fraktionen wurde gezählt und im Schaubild aufgetragen. Nach Zugabe von ^{3}H-Glycin und ^{3}H-Phenylalanin zu den Proteinhydrolysaten konnte die Zuordnung der Positionen der Aminosäuren in der Analyse (Pfeile) zu den Radioaktivitätsgipfeln erfolgen.

3.4. Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäuren von Lipoprotein aus Wildtyp- und JE 5511 "lpm"-Zellen

Die Einbauversuche mit ^{14}C-Acetat geben einen Hinweis darauf, daß trotz des Vorhandenseins von Glycerylcystein im Lipoprotein aus JE 5511 dort weniger Fettsäuren gebunden sind als am Wildtyp-Lipoprotein. Die absolute Menge und Zusammensetzung der Fettsäuren wurde mit Hilfe des Gaschromatographen bestimmt. Abbildung 5 zeigt typische Chromatogramme von Fettsäuren aus "lpm"- und Wildtypprotein. Der Vergleich dieser Chromatogramme läßt deutlich die reduzierte Menge von ungesättigten Fettsäuren des "lpm"-Lipoproteins erkennen.

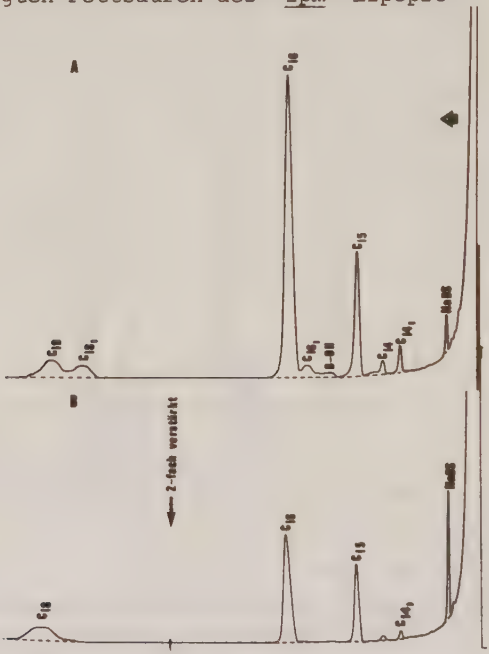


Abbildung 5: Gaschromatogramme von Fettsäuremetylestern aus Wildtyp- und "lpm"-Lipoprotein (A bzw. B). Die Fettsäuren wurden mit Petroläther aus sauren Lipoproteinhydrolysaten extrahiert, mit Diazomethan verestert und auf einer OV 1-Säule bei 170° C isotherm getrennt. Die Identifizierung der Fettsäuren erfolgte durch Vergleich der Elutionszeiten der einzelnen Komponenten und durch Cochromatographie mit einem Standard mit bekannten Komponenten (Serva).

Tabelle 6: Fettsäureanalysen von freiem Lipoprotein und Murein-Lipoprotein-Komplex aus JE 5511 "lpm" und freiem Lipoprotein aus E. coli B/r

Fettsäure	WT-FLP	"lpm"-FLP	"lpm"-MMLP
C_{14}	9 %	11 %	14 %
C_{16}	55 %	71 %	63 %
$C_{16:1}$	6 %	8 %	9 %
$C_{17\ cyclo}$	4 %	< 1 %	< 1 %
C_{18}	14 %	6 %	8 %
$C_{18:1}$	12 %	4 %	6 %
Mol Fettsre. /Mol Lipopr.	2,61	0,71	0,76

Diese Werte stellen Mittelwerte von 5 Bestimmungen dar, die mit Lipoprotein aus 2 Aufarbeitungen durchgeführt wurden; die Standardabweichung betrug 0,2. Für beide Aufarbeitungen von "lpm"-Lipoprotein wurden Zellen verwendet, die in e i n e m 200 l-Fermenter mit M 9-Minimalmedium gezüchtet wurden. Wildtyp-Lipoprotein wurde aus E. coli B/r-Zellen von Merck isoliert.

Tabelle 6 zeigt Zusammensetzung und absolute Mengen der Fettsäuren aus JE 5511 und E. coli B/r-Lipoprotein (92). Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß am "lpm"-Lipoprotein nur eine Fettsäure gebunden ist. Außerdem unterscheidet sich die Fettsäurezusammensetzung von Lipoprotein in beiden Stämmen: "lpm"-Lipoprotein enthält mehr gesättigte und weniger ungesättigte bzw. Cyclopropanfettsäuren als Wildtyp-Lipoprotein. HANTKE beschreibt die Zusammensetzung von amid- und estergebundenen Fettsäuren von Lipoprotein (37) - amidgebundene Fettsäuren sollen einen höheren Gehalt an gesättigten Fettsäuren aufweisen als die estergebundenen Fettsäuren, deren Zusammensetzung sehr ähnlich ist wie die der Phospholipidfettsäuren. Deshalb lag die Vermutung nahe, daß es sich bei der am "lpm"-Lipoprotein gebundenen Fettsäure um die Säureamidfettsäure am N-terminalen Ende des Proteins handelt.

3.5. Infrarotspektroskopie

In Infrarotspektren von Wildtyp-Lipoprotein, die mit einer hochauflösenden Technik (78) angefertigt wurden (21), tritt bei der Wellenzahl 1740 cm^{-1} eine deutliche Bande auf, die auf die C=O-Streckschwingung der Fettsäureester von Glycerylcystein zurückzuführen ist.
Abbildung 6 zeigt Infrarotspektren von Wildtyp-FLP und "lpm"-FLP. Die Carbonylbande von "lpm"-Lipoprotein ist nur sehr schwach ausgeprägt; dies zeigt, daß die Reduktion der Fettsäurezahl auf Kosten der estergebundenen Fettsäuren erfolgen muß. JE 5511-Lipoprotein enthält also nur die säureamidgebundene Fettsäure im Lipidteil des Proteins.

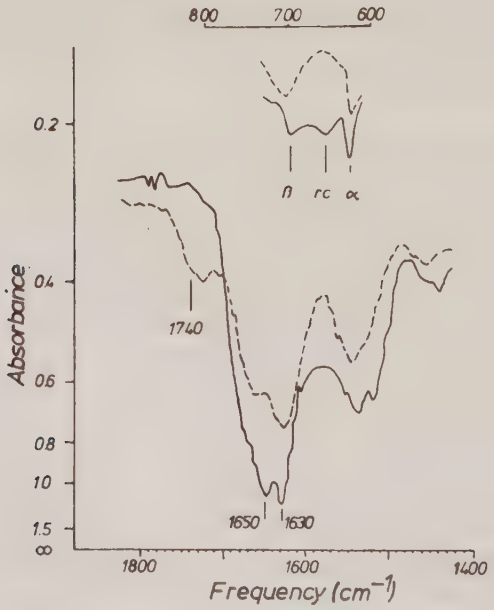


Abbildung 6: Infrarotspektren von getrockneten Filmen von freiem Wildtyp-Lipoprotein (---) und freiem Mutanten-Lipoprotein (——).

3.6. Zusammenfassung: Eigenschaften von Lipoprotein aus E. coli JE 5511 "lpm"

3.1. bis 3.5. zusammenfassend läßt sich feststellen:

1) Eine Punktmutation im Lipoproteingen von JE 5511 führt zu einem Aminosäureaustausch, wobei das am C-terminalen Ende der Polypeptidkette gelegene Arginin Nr. 57 gegen Cystein ausgetauscht ist.
2) Lipoprotein aus JE 5511 enthält Glycerylcystein und amidgebundene Fettsäure, die Zahl der estergebundenen Fettsäuren ist jedoch stark reduziert: um 1,4 nach Einbauversuch mit ^{14}C-Acetat, um 2 nach gaschromatographischer Bestimmung.

Es ist unklar, ob das Fehlen der estergebundenen Fettsäuren ein pleiotropher Effekt der Peptidmutation ist, oder ob eine zweite Mutation im Genom von JE 5511 zu einer Reduzierung der estergebundenen Fettsäuren von Lipoprotein führt.

3.7. Konformationsuntersuchungen

In der Hoffnung, aus den Kenntnissen über die Sekundärstruktur von Lipoprotein Aussagen ableiten zu können über dessen Funktion in der Zellhülle von E. coli und anderen gram-negativen Bakterien, wurde die Konformation von Lipoprotein mit Circulardichroismusmessungen und Infrarotspektroskopie untersucht (91). Abbildung 7 zeigt ein Modell, das aufgrund solcher Untersuchungen und mit Hilfe der Chou-Fasman-Regeln (26) zur Ermittlung von Proteinsekundärstrukturen aus den bekannten Aminosäuresequenzen vorgeschlagen wurde (21).
Bei Konformationsuntersuchungen mit Lipoprotein, für das bisher weder Rezeptor- noch enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnten, stellt sich die Frage, ob mit solchen Messungen in wässriger Lösung - zumal an einem Molekül, das durch Behandlung der Zellhüllen mit heißer Dodecylsulfatlösung isoliert wurde - Aussagen zur Struktur des

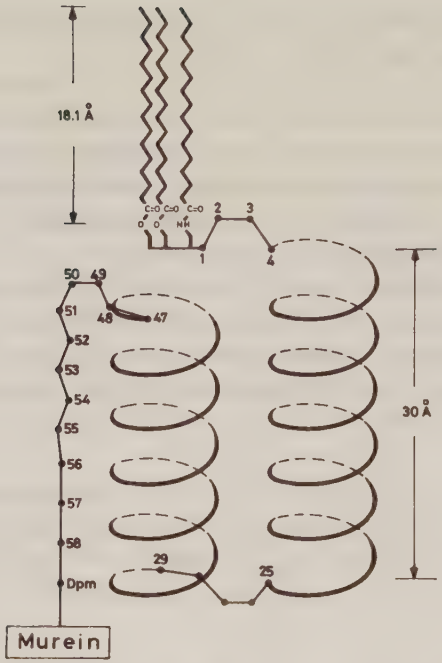


Abbildung 7: Hypothetisches Modell, das die nach den Chou-Fasman-Regeln (26) ermittelten helicalen und nicht-helicalen Bereiche des Lipoproteinmoleküls zeigt (21). Der Lipidteil des Moleküls ist so gezeichnet, daß er in die innere Lipidschicht der äußeren Membran integriert sein könnte. Die hydrophoben Bereiche beider α-Helices könnten sowohl miteinander - mit hydrophoben Bereichen anderer Membranproteinmoleküle wie z.B. von freiem Lipoprotein oder Matrixprotein - oder mit hydrophoben Bereichen der äußeren Membran (Phospholipide, Lipid A) wechselwirken. Die Aminosäurereste sind in α-helicaler Konformation (3), in β-Faltblattstruktur (Z) oder in Knäuelstruktur (-) gezeichnet. Die Faltung der Polypeptidkette zwischen den Resten 25 - 28 erfolgt durch eine β-Schleife (β-loop).

Proteins in der Zellmembran gemacht werden können. Zwei Befunde rechtfertigen solche Untersuchungen:
Zum einen spaltet Trypsin das Lipoprotein sowohl in der Zellhülle wie auch in isolierter Form bevorzugt an den Aminosäureresten Nr. 55 und Nr. 57 (13, 19, 92) und läßt die

anderen sechs potentiellen Spaltstellen intakt. Die resistenten Spaltstellen liegen nach dem Modell in Abbildung 7 im α-Helixbereich, womit die Trypsinresistenz erklärbar wird. In diesem Zusammenhang könnten Untersuchungen der Konformation von "lpm"-Lipoprotein interessant sein, da dieses in tryptische Peptide spaltbar ist (54, 106).
Zum anderen kreuzreagieren Antiseren gegen isoliertes und in der Membran befindliches Lipoprotein (10, 14, 63). Enzyme wie auch Antikörper erkennen ähnliche Konformationen, z.B. des nativen und isolierten Lipoproteins.
Bei ersten Konformationsuntersuchungen mit Lipoprotein wurde eine hohe Stabilität der Sekundärstruktur gegen das denaturierende Detergens Natriumdodecylsulfat (NaDS) festgestellt (91). Detergenzien, auch ionische wie etwa NaDS, werden wegen ihrer amphipathischen Eigenschaften zur Simulierung von Membranumgebungen bei der Charakterisierung von Membranproteinen verwendet (42, 109). Deshalb wurde das Verhalten von Lipoprotein in Lösungen verschiedener Detergenzien untersucht.

3.7.1. Infrarotspektroskopische Konformationsuntersuchungen

Abbildung 8 zeigt Infrarotspektren von Lipoprotein II aus Wildtypzellen: Das Auftreten der Amid I-Bande bei 1650 cm^{-1} läßt auf α-helicale und/oder ungeordnete Struktur schließen. Die Schulter bei 1630 cm^{-1} weist auf ca. 15 Proz. β-Struktur hin. Nach Deuterierung der Probe wurde kein Positionswechsel der Amid I-Bande auf eine niedrigere Frequenz beobachtet. Daraus resultiert, daß die Amid I-Bande bei 1650 cm^{-1} auf α-helicale Struktur im Proteinmolekül zurückzuführen ist (68, 112). Auch nach dem Trocknen der Probe verschiebt sich die Bande nicht auf eine höhere Frequenz wie das bei ungeordneter Struktur der Fall ist. Eine kleine Schulter bei 1685 cm^{-1} zeigt einen Breich mit antiparalleler β-Struktur an (68, 112). Bei diesen Spektren von Wildtyp-Lipoprotein findet man eine C=O-Streckschwingungsbande bei 1740 cm^{-1}, die auf die Fettsäureester am Glycerylcystein zurückzuführen ist.

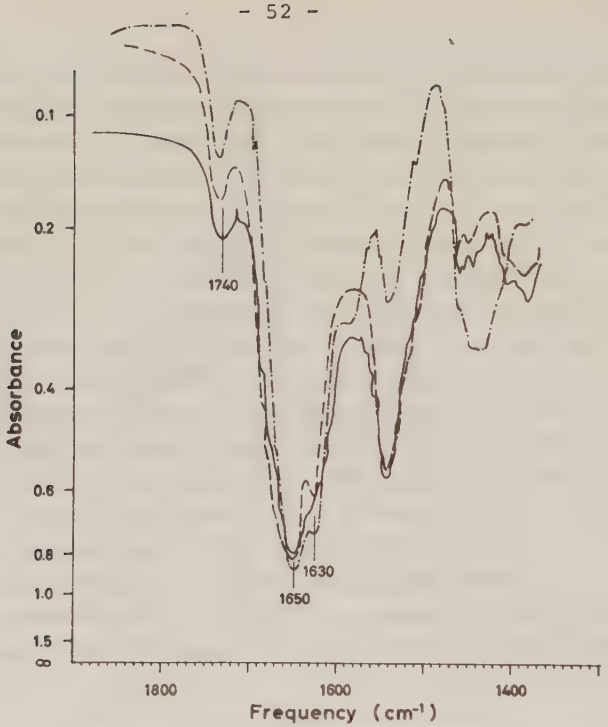


Abbildung 8: Infrarotspektren von Lipoprotein II in einer zu 90 Proz. mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre (——), getrocknet (---), und nach 24-stündigem Einwirken von ^2H_2O (-·-).

Bei einem Vergleich der Spektren von Lipoprotein II mit den in Abbildung 6 wiedergegebenen Infrarotspektren von freiem Lipoprotein aus Wildtyp- und Mutantenzellen wird deutlich, daß hier die Amid I-Bande in zwei Banden bei 1650 cm^{-1} und bei 1630 cm^{-1} aufgespalten ist. Beide Proteine müssen also beträchtliche Anteile von β-Strukturbereichen enthalten. Zur Klärung der Frage, ob die Banden bei 1650 cm^{-1} auf α-Helix oder ungeordnete Struktur schließen lassen, wurden in diesem Falle die Spektren bis zum Bereich von 800 - 600 cm^{-1} aufgenommen: Die mit β bezeichnete Bande bei 692 cm^{-1} zeigt β-Faltblattstruktur an, die mit r. c. bezeichnete Bande bei 650 cm^{-1} ungeordnete Struktur und die mit α bezeichnete Bande bei 620 cm^{-1} α-helicale Struktur.

Ungeordnete Struktur findet sich nur in freiem Lipoprotein aus JE 5511 "lpm"-Zellen. Freies Lipoprotein aus Wildtypzellen weist nur Bereiche mit α-helicaler- und β-Faltblattstruktur auf, wobei eine kleine Schulter bei 1685 cm^{-1} wieder auf einen antiparallelen Bereich hindeutet.
Das Auftreten von Bereichen mit ungeordneter Struktur im JE 5511-Lipoprotein könnte dessen Spaltbarkeit mit Trypsin verursachen.

3.7.2. Circulardichroismusmessungen

Konformationsänderungen von Proteinen, die von verschiedenen Agenzien verursacht werden können, lassen sich besonders gut durch die Messung des Circulardichroismus verfolgen. Abbildung 9 zeigt CD-Spektren von Lipoprotein I und Lipoprotein II aus E. coli B/r in 0,01 M Na_2HPO_4 pH 7 mit und ohne Zusatz von 1 Proz. Natriumdodecylsulfat. Bei der Berechnung des α-Helixgehaltes aus den in Pufferlösung ohne NaDS aufgenommenen Spektren nach der isodichroitischen Methode von MYER (69) in der Abwandlung nach ROSENKRANZ und SCHOLTAN (89, 90) erhält man 81 Proz. α-Helix für Lipoprotein I und 84 Proz. α-Helix für Lipoprotein II; diese Werte liegen innerhalb der Fehlergrenze der Methode von ± 2,5 Proz. Trotz des Fehlens von Muropeptid und der drei C-terminalen Aminosäuren hat Lipoprotein II dieselbe Konformation wie Lipoprotein I (21, 91).

3.7.2.1. Verhalten von Murein-Lipoprotein in Natriumdodecylsulfat-Lösungen

Die geordnete Struktur von Lipoprotein in Pufferlösung verändert sich bei Zugabe von NaDS bis zu einer Konzentration von 5 mM nicht. Bei Überschreiten dieser Konzentration beginnt der α-Helixgehalt von Murein-Lipoprotein kooperativ auf ca. 50 Proz. α-Helix abzusinken. Die NaDS-Konzentration, bei der Lipoprotein denaturiert, ist um den Faktor 5

bis 10 höher als normalerweise bei globulären Proteinen beobachtet worden ist (85). Abbildung 9 zeigt ein CD-Spektrum von denaturiertem Lipoprotein II in einprozentiger Lösung von NaDS.

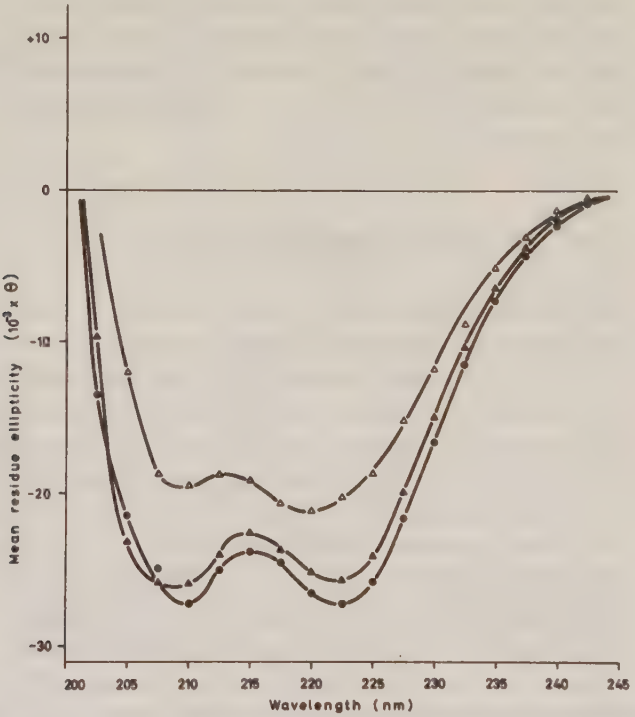


Abbildung 9: CD-Spektren von Lipoprotein.
Lipoprotein I (-·-) und Lipoprotein II (-▲-) in Na_2HPO_4-Puffer (0,01 M, pH 7) und Lipoprotein II im selben Puffer + 1 Proz. NaDS (-Δ-). Die Messungen wurden bei 22° C (-·-▲-) und 37° C (-Δ-) durchgeführt.

3.7.2.2. Denaturierung von Murein-Lipoprotein und NaDS-Micellenbildung

Abbildung 10 zeigt das Ergebnis eines Experiments, bei dem die Micellenbildung in NaDS-Lösungen steigender Konzentration mit und ohne Lipoprotein durch Anfärben der Micellen mit Methylorange (2,4-Dimethylaminoazobenzol) optisch ver-

folgt und zusammen mit der Konformationsänderung von Lipoprotein bei steigenden NaDS-Konzentrationen aufgetragen ist. Die Konformationsänderung von Lipoprotein beginnt bei derselben NaDS-Konzentration, bei der auch die Micellenbildung einsetzt.

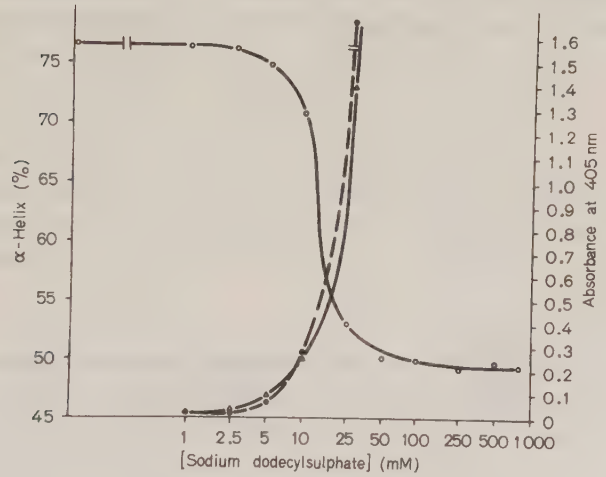


Abbildung 10: α-Helixgehalt von Lipoprotein II bei steigenden Konzentrationen von NaDS in 0,01 M Na_2HPO_4-Puffer pH 7 und Micellenkonzentrationen in den entsprechenden Proben.
Es wurden CD-Spektren von Lipoprotein II in NaDS-Lösungen steigender Konzentration aufgenommen und die α-Helixgehalte (linke Ordinate) aufgezeichnet (-o-). Die Micellenkonzentrationen in diesen Proben (-●-) und in NaDS-Lösungen ohne Lipoprotein (-Δ-) wurde mit 2,4-Dimethylaminoazobenzol bestimmt und in Extinktionseinheiten (rechte Ordinate) aufgetragen. Bei 25 mM NaDS wurde eine Extinktion von ca. 2,5 gemessen. Die Messungen wurden bei 22° C durchgeführt, nachdem die Lipoproteinproben etwa 3 Std. gelöst waren.

3.7.2.3. Denaturierung von Murein-Lipoprotein in NaDS-Lösung, ein kooperativer Prozeß

Der sigmoide Verlauf der Denaturierungskurve in Abbildung 10 läßt eine kooperative Interaktion von Lipoproteinmolekülen mit Detergensmicellen wahrscheinlich erscheinen. Um dies zu prüfen wurde in Abbildung 11 die scheinbare Gleichgewichtskonstante $K = \frac{[\text{denaturiertes LP}]}{[\text{natives LP}]}$ gegen den Logarithmus der NaDS-Konzentration aufgetragen. Die scheinbare Gleichgewichtskonstante K zwischen denaturiertem und nati-

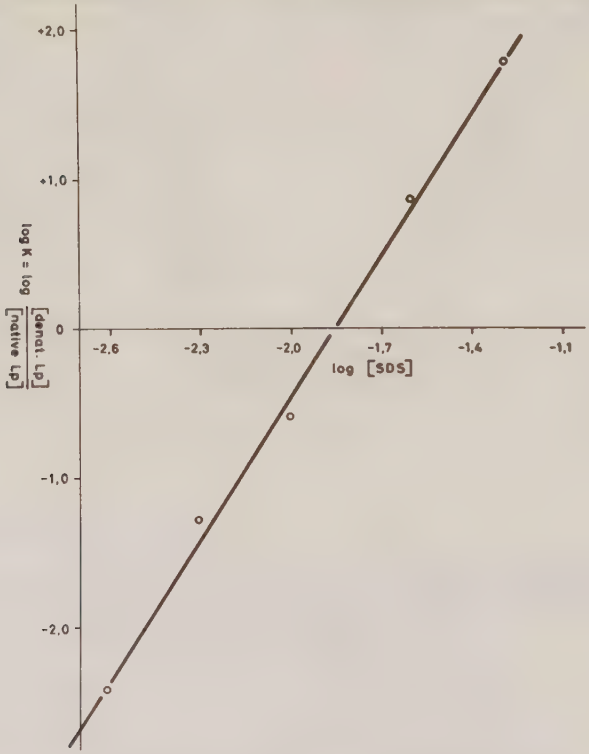


Abbildung 11: Abhängigkeit des Logarithmus der Gleichgewichtskonstante K vom Logarithmus der NaDS-Konzentration.
$K = \frac{[\text{denaturiertes LP}]}{[\text{natives LP}]}$ wurde aus den Werten von Abbildung 10 berechnet; log K wurde gegen log [NaDS] aufgetragen.

vem Lipoprotein wurde unter der Prämisse berechnet, daß die molaren Elliptizitäten bei 209 nm (Θ_{209}) bei gegebenen NaDS-Konzentrationen der Summe von (Θ_{nativ}) x (1 - f_d) + ($\Theta_{denat.}$) x (f_d) entsprechen, wobei f_d den Bruchteil der aufgefalteten Moleküle angibt.
Die Kurve in Abbildung 11 kann durch eine Gerade mit der Gleichung log K = log K_o + n log C beschrieben werden. K_o ist eine Konstante für das denaturierende System und die Steigung n gibt die Zahl der Micellen des denaturierenden Agens Natriumdodecylsulfat an, die kooperativ die Konformation von Mureinlipoprotein verändern (96).
In diesem Falle ist $K_o = 2 \times 10^{-3}$ und die Steigung n beträgt 4,1.
Wird das NaDS über eine Säulenchromatographie auf Sephadex G 75 entfernt, wonach noch ein Mol NaDS pro Mol Lipoprotein gebunden bleibt, wird wieder ein α-Helixgehalt von 30 Proz. gemessen.

3.7.2.4. CD-Konformationsuntersuchungen mit freiem Lipoprotein: Konformation von freiem Lipoprotein aus Wildtyp und "lpm"-Mutante in Puffer- und Detergenslösungen

Abbildung 12 zeigt CD-Spektren von E. coli B/r FLP und JE 5511 FLP in Pufferlösung pH 7,5 und in derselben Pufferlösung mit 1 Proz. NaDS.
Ebenso wie bei den Infrarotspektren zeigen sich verschiedene Sekundärstrukturen bei freiem Lipoprotein aus Wildtypzellen, aus "lpm"-Mutantenzellen und Lipoprotein II in wässriger Lösung. Vergleicht man die Spektren aus Abbildung 12 mit einer Schar von computerberechneten Modellspektren (99), so kann eine Kurve mit 60 Proz. β-Struktur und 40 Proz. ungeordneter Struktur am besten mit einem Spektrum der nach INOUYE (55) isolierten freien Form des Wildtyplipoproteins in Übereinstimmung gebracht werden. Das Spektrum von freiem "lpm"-Lipoprotein kann am genauesten mit einer Modellkurve aus 40 Proz. β-Struktur, 40 Proz. α-Helix und 20 Proz. ungeordneter Struktur beschrieben werden.

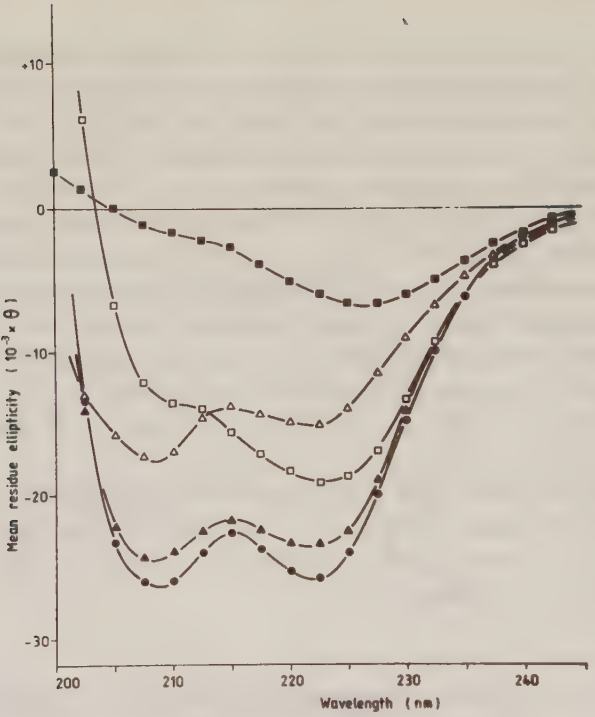


Abbildung 12: CD-Spektren von freiem Lipoprotein. Freies Lipoprotein aus Wildtyp- (-■-) und Mutantenzellen (-□-) in 0,01 M Na_2HPO_4-Puffer pH 7,5; freies Lipoprotein aus Wildtyp- (-Δ-) und "lpm"-Mutantenzellen (-Δ-) im selben Puffer mit 1 Proz. NaDS. Zum Vergleich ist ein Spektrum von Lipoprotein II in Puffer ohne Detergens (-●-) und freiem Lipoprotein aus WT-Zellen in Na_2HPO_4-Puffer mit 2,5 mM NaDS (-▲-) eingezeichnet.

Spaltet man die esterartig gebundenen Fettsäuren von Lipoprotein II aus Wildtypzellen durch Verseifung mit 0,1 N NaOH bei 56° C (1 Std.) ab, so reduziert sich der α-Helixgehalt in dieser Probe, die dem lpm-Lipoprotein ähnlich ist, auf 50 Proz. α-Helix. Wird jedoch freies Lipoprotein aus Wildtyp und Mutante in 1 Proz. NaDS-Pufferlösung gelöst, so erhält man nahezu identische Spektren, aus denen sich ein α-Helixgehalt von 54 Proz. errechnen läßt. Dies ist fast derselbe Wert, der für Lipoprotein II in 1 Proz. NaDS ermittelt wurde (vgl. Abbildung 9).

Untersucht man die Konformation von freiem Wildtyp-Lipoprotein, das nach einer von HENNING et al. beschriebenen Methode (44) isoliert wurde, in Pufferlösung, ergibt sich ein mit Lipoprotein II nahezu identisches Spektrum (18). Folgende Interpretation dieser Daten bietet sich an: Bei der Aufarbeitung nach INOUYE (55) wird ein denaturiertes freies Lipoprotein gewonnen, das erst in lipophiler Umgebung wieder partiell renaturiert.

3.7.2.5. Konformationsänderung von Lipoprotein durch Einwirken zweiwertiger Ionen

Da nach INOUYE isoliertes freies Lipoprotein aus Wildtyp und "lpm"-Mutante in NaDS-Lösungen partiell renaturiert, und weil der letzte Schritt der Isolierung eine Mg^{++}/Acetonfällung von Lipoprotein aus einprozentiger NaDS-Lösung darstellt, muß das Einwirken von Aceton und Magnesiumionen auf Lipoprotein zu dessen Denaturierung führen.
Aufgrund dessen wurde der Einfluß von Magnesiumionen auf die Konformation von Lipoprotein I und Lipoprotein II untersucht. Bei beiden Proben führt die Zugabe von 0,1 M $MgSO_4$ zu starker Denaturierung des Lipoproteins: So reduziert sich der α-Helixgehalt in einer Probe von LP I bei Zugabe von 0,1 M $MgSO_4$ von 81 Proz. auf 56 Proz. und in einer mit Matrixprotein verunreinigten Probe (durch Elektrophorese nachgewiesen) von LP II von 78 Proz. auf 27 Proz. Mit einer 0,1 M $CaCl_2$-Lösung läßt sich der α-Helixgehalt der LP I-Probe von 81 Proz. auf 63 Proz reduzieren. Einwertige Ionen wie Na^+ oder K^+ führen bei dieser und bei höheren Konzentrationen (bis 0,5 M gemessen) zu keiner Änderung der Konformation von Lipoprotein.
Zweiwertige Ionen führen also zu Konformationsänderungen bei Lipoprotein.

3.7.2.6. Konformationsänderungen von freiem Lipoprotein und Micellenbildung in Natriumdodecylsulfat-Lösungen

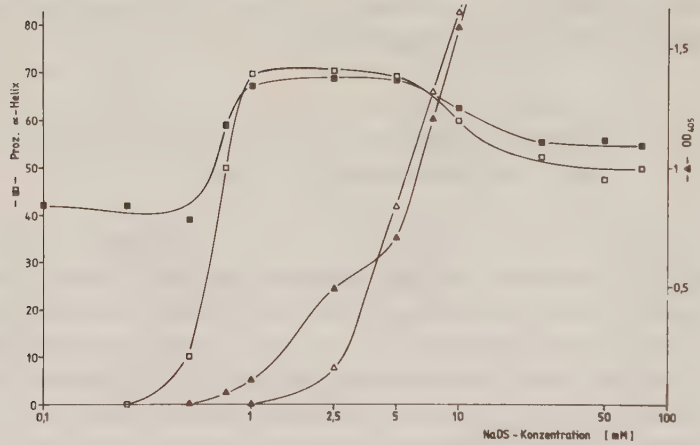


Abbildung 13: α-Helixgehalt von freiem Lipoprotein aus Wildtyp und "lpm"-Mutante bei steigender Konzentration von NaDS in 0,01 M Na_2HPO_4-Puffer pH 7,5 und Micellenkonzentrationen in den entsprechenden Proben.
Die α-Helixgehalte von freiem Lipoprotein aus Wildtyp (-□-) und Mutante (-■-) wurden mit CD-Spektroskopie bestimmt und aufgezeichnet (linke Ordinate).
Die Micellenkonzentration in diesen Proben (-▲-) und in NaDS-Lösungen ohne Lipoprotein (-Δ-) wurde mit 2,4-Dimethylaminoazobenzol bestimmt und in Extinktionseinheiten aufgetragen (rechte Ordinate). Die Messungen wurden bei 22° C durchgeführt, nachdem die Lipoproteinproben etwa 5 Std. gelöst waren.

Abbildung 13 zeigt das Verhalten von freiem Lipoprotein aus Wildtyp und "lpm"-Mutante in NaDS-Lösungen mit steigenden Konzentrationen. Wie auch in Abbildung 10 ist die Micellenbildung durch Anfärben mit Methylorange und Messen der optischen Dichte bei 405 nm verfolgt worden. Die parallele Untersuchung des Verhaltens der freien Form des Mutanten- und Wildtyp-Lipoproteins gegenüber NaDS mit Hilfe der CD-Messung bei 209 nm zeigte, daß beide Proteine sich prinzipiell gleich verhalten. Die Ausgangslage war allerdings unterschiedlich, da zu Beginn der Versuchsreihe ohne NaDS beim Wildtyp-Protein kein α-Helixgehalt meßbar war, das Mutanten-Protein jedoch 40 Proz. α-helicalen Anteil aufwies. Bei Erreichen einer Konzentration von 0,5 mM NaDS steigt der α-Helixgehalt des Wildtyp-Proteins von 0 Proz. auf 70 Proz., der des Mutantenproteins von 40 Proz. auf 66 Proz. Nach Entfernung von NaDS über Sephadex G 75 bleibt diese Konformation erhalten (vgl. Abbildung 12). Im Bereich von 10 mM bis 25 mM NaDS fällt der α-Helixgehalt auf 56 bzw. 53 Proz. In diesem Konzentrationsbereich reduziert sich auch der α-Helixgehalt des mit Trypsin vom Murein freigesetzten Lipoproteins II von 80 Proz. auf 52 Proz. (vgl. Abbildung 10).

3.7.2.7. Verhalten von freiem Lipoprotein aus Wildtyp und "lpm"-Mutante in Natriumdesoxycholatlösung

Abbildung 14 zeigt CD-Spektren von Wildtyp- und "lpm"-Protein, die in Puffer und in gepufferter Natriumdesoxycholatlösung aufgenommen wurden. Bei drei Messungen von Wildtypprotein in gepufferter 8,6 x 10^{-3} M Natriumdesoxycholatlösung wurden α-Helixgehalte zwischen 72 Proz. und 76 Proz. ermittelt, bei "lpm"-Lipoprotein lagen die α-Helixgehalte jedoch nur zwischen 52 Proz. und 56 Proz. Das Fehlen der Fettsäuren und/oder die Peptidmutation im "lpm"-Lipoprotein wirkt sich also nur auf die Konformation in Natriumdesoxycholat aus: Das nach INOUYE isolierte freie Lipoprotein aus Wildtypzellen renaturiert in Natriumdesoxycholatlösung, wo-

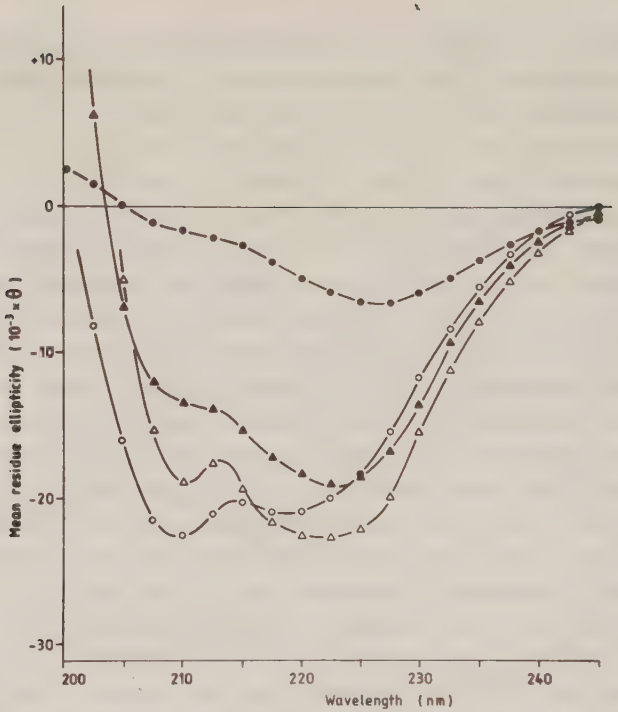


Abbildung 14: CD-Spektren von freiem Lipoprotein. E. coli B/r Lipoprotein in 0,01 M Na_2HPO_4-Puffer pH 7,5 (-●-) und identischem Puffer mit 8,6 x 10^{-3} M Natriumdesoxycholat (-o-), freies Lipoprotein aus JE 5511 in Puffer (-▲-) und in Puffer mit Desoxycholat (-Δ-).

bei der α-Helixgehalt von 0 Proz. auf 75 Proz. steigt - ein Wert, der dem α-Helixgehalt von freiem Lipoprotein in NaDS-Lösungen unter der kritischen Micellenkonzentration entspricht, und der annähernd so hoch liegt wie der von Lipoprotein I oder Lipoprotein II in wässriger Lösung. Der α-Helixgehalt von "lpm"-Lipoprotein steigt in Desoxycholatlösung von 40 Proz. auf nur 54 Proz.; das entspricht dem α-Helixgehalt in NaDS über der kritischen Micellarkonzentration.

3.8. Genetische Untersuchungen mit Lipoproteinmutanten

Bei der Charakterisierung von Lipoprotein aus JE 5511-Zellen konnte gezeigt werden, daß sich dieses in zwei Eigenschaften von Lipoprotein aus Wildtypzellen unterscheidet, durch

- den Aminosäureaustausch Arginin - Cystein und
- das Fehlen von Fettsäuren, die am Glycerinteil des Lipoproteins kovalent gebunden sind.

Zur Klärung des Problems, ob das Fehlen dieser Fettsäuren ein pleiotropher Effekt der Peptidmutation ist oder ob hier eine Doppelmutation im Peptidgen und in einem Schritt der Biosynthese des Lipidteils von Lipoprotein vorliegt, wurde Lipoprotein aus einem merodiploiden E. coli-Stamm JE 5549 "lpm" F' "lpm"$^+$ untersucht (93). Dem lag folgende Überlegung zugrunde: Sollte die Peptidmutation dazu führen, daß keine Fettsäuren an den Glycerinteil des Lipoproteins gebunden werden können, so müßten sich bei gleichen Mengen von "lpm"- und Wildtyp-Lipoprotein in Zellen vom Stamm JE 5549 nur zwei Mol Fettsäuren pro Mol Lipoprotein bestimmen lassen, da am "lpm"-Lipoprotein nur eine, am Wildtypprotein drei Fettsäuren gebunden sind.

3.8.1. Lipoprotein aus einem merodiploiden Stamm JE 5549 "lpm" recA F' "lpm"$^+$

Aus Zellen einer 10 l-Kultur von JE 5549 in M 9-Medium mit Mannose als C-Quelle wurde Murein-Lipoprotein-Komplex und freies Lipoprotein isoliert und delipidiert. Aliquots beider Proteine wurden in bidest. 6 N HCl 18 Std. bei 105° C unter N_2 hydrolysiert und anschließend zur Fettsäurebestimmung zweimal mit Petroläther extrahiert. Von den extrahierten Hydrolysaten wurden Aminosäureanalysen angefertigt, die zur Proteinbestimmung dienten. Außerdem wurde mit diesen Analysen das Lysin/Arginin-Verhältnis in den Proben berechnet.

Tabelle 7 zeigt, daß in den Zellen, die das mutierte Lipoprotein-Gen im Chromosom und ein intaktes Lipoprotein-Gen auf einem Plasmid tragen, modifiziertes und intaktes Lipoprotein synthetisiert wird. Plasmid und Chromosom sind in der Expression des Lipoprotein-Gens codominant.

Tabelle 7: Verhältnis von Arginin zu Lysin in Lipoprotein aus JE 5549 "lpm" F' "lpm"$^+$

Protein	Arginin	Lysin
WT-Lipoprotein	4	5
"lpm"-Lipoprotein	3	5
JE 5549 MMLP	3,5	5
JE 5549 FLP	3,4	5

Für Wildtyp- und "lpm"-Lipoprotein sind die aus der Sequenz bekannten Werte angegeben, für Murein-Lipoprotein-Komplex (MMLP) und freies Lipoprotein (FLP) aus JE 5549 die mit dem Aminosäureanalysator bestimmten Werte.

Aus den Petrolätherextrakten wurden die Fettsäuren nach Veresterung mit Diazomethan gaschromatographisch bestimmt. Tabelle 8 zeigt Fettsäurezusammensetzung und -menge von freiem Lipoprotein und Murein-Lipoprotein-Komplex sowohl aus merodiploiden JE 5549-Zellen als auch von Murein-Lipoprotein-Komplex des Stammes 5525 "lpm", aus dem JE 5549 durch Einführen des F' "lpm"$^+$-Plasmids hervorging.
Die Fettsäurezusammensetzung von Lipoprotein aus beiden Stämmen ist sehr ähnlich und weist keine signifikanten Unterschiede auf. Ebenso zeigt sich, daß am Lipoprotein aus beiden Stämmen je drei Fettsäuren gebunden sind, sowohl am "lpm"-Lipoprotein aus JE 5525 wie auch am zur Hälfte aus den "lpm"- und "lpm"$^+$-Modifikationen zusammengesetzten Lipoprotein aus JE 5549. Je 5525 besitzt also Lipoprotein mit freier S-H-Gruppe, obwohl am Glycerylcystein drei Fettsäuren gebunden sind. Die Peptidmutation im Lipoprotein-Gen kann demnach nicht die Ursache für das Fehlen der Diglyceridfettsäuren im Lipoprotein von JE 5511 "lpm" sein. JE 5511 ist eine Lipoprotein-Doppelmutante, die in dem Genort

lpp = Lipoprotein-Peptidgen und in einem anderen, davon unabhängigen Genort *lpm* = Lipoprotein mit modifiziertem Lipidteil mutiert ist (93). Die genetischen Merkmale von JE 5511 sind deshalb HfrC *man lpp pps lpm*, die von JE 5525 F⁻ *recA*$_1$ *man lpp pps trp gal str* und die von JE 5549 *recA*$_1$ *man lpp pps trp gal str* F' *man*$^+$ *lpp*$^+$ *aroD*$^+$ *pps*$^+$. Die bisher benützte Bezeichnung "*lpm*" stand also, da nur für JE 5511 verwendet, für *lpp* = mutiertes Peptidgen und *lpm* = modifizierter Lipidteil von Lipoprotein.

Tabelle 8: Fettsäureanalysen von Lipoprotein aus JE 5525 "*lpm*" und JE 5549 "*lpm*" F' "*lpm*"$^+$

Fettsäure	JE 5549		JE 5525
	MMLP	FLP	MMLP
C_{14}	8 %	6,7 %	8,8 %
$C_{14:1}$	4,5 %	3,5 %	4,7 %
C_{16}	53,4 %	56,1 %	53,9 %
$C_{16:1}$	7,2 %	7,8 %	2,0 %
$C_{17:c}$	< 1 %	2,2 %	9,1 %
C_{18}	11 %	10,8 %	9,6 %
$C_{18:1}$	6,9 %	9,8 %	3,1 %
$C_{19:c}$	4,8 %	1,1 %	3,8 %
n. best.	4,1 %	2 %	5,1 %
nMol Fettsäuren pro nMol Protein*	3,04^b	2,84^a	2,94^a

* Diese Werte stellen Mittelwerte von je zwei Bestimmungen dar, die mit Lipoprotein aus einer (a) oder zwei (b) Aufarbeitungen durchgeführt wurden. Das Medium, das zur Anzucht der Zellen verwendet wurde, enthielt im Falle von JE 5549 *man*⁻ F' *man*$^+$ Mannose als C-Quelle, um nur Zellen mit F'-Partikeln zu erhalten.

3.8.2. Kartierung des mutierten Gens, das den modifizierten Lipidteil von Lipoprotein (lpm-Phänotyp) bewirkt: Versuche zur Charakterisierung des lpm-Phänotyps

Der Genort für die Peptidmutation des Lipoprotein-Gens ist bekannt, da HIROTA et al. die Dimerenbildung des lpp-Lipoproteins über Disulfidbrücken als phänotypische Eigenschaft zur Kartierung des Gens benützen konnten (106). Die im folgenden beschriebenen Experimente dienten dazu, Eigenschaften von JE 5511 (und anderen Hirota-Stämmen) zu finden, die auf die lpm-Mutation zurückzuführen sind.

3.8.2.1. Versuche mit Trypsin

BRAUN et al. beschreiben einen optischen Test (19), mit dem der Trypsin-Abbau von E. coli-Zellwänden photometrisch verfolgt wurde. Da Lipoprotein aus JE 5511 in tryptische Peptide spaltbar ist (54, 106), könnte die Geschwindigkeit der Abnahme der optischen Dichte von Zellwänden aus JE 5511 durch die lpm- und/oder lpp-Eigenschaft beeinflußt werden. Zellwände von E. coli K 12 Wildtypzellen und von JE 5511 wurden wie in (19) beschrieben mit Trypsin behandelt. Es ließ sich jedoch kein Unterschied im optischen Verhalten von Wildtyp- und Mutantenzellwänden feststellen. Auch bei der Trypsinbehandlung ganzer Zellen - statt Zellwänden wurden ganze Zellen verwendet, die zum Teil auch mit EDTA vorbehandelt waren - zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante.

3.8.2.2. Optischer Test: Sphäroplastenbildung mit EDTA/Lysozym

HIROTA et al. gelang die Isolierung einer E. coli-Mutante, in der kein mit immunologischen Methoden und Elektrophorese nachweisbares freies und auch kein mureingebundenes Lipoprotein synthetisiert wird: Der Genort dieser, mit lpo be-

zeichneten Mutation liegt bei 36,4 Min. auf dem E. coli-Chromosom. Es muß sich dabei um eine Deletionsmutation im Peptidgen von Lipoprotein handeln (48). Dieser E. coli-Stamm ohne Lipoprotein kann unter Laborbedingungen wachsen, die Zellen sind jedoch extrem empfindlich gegen EDTA-Einwirkung und Magnesiummangel im Medium (45). Deshalb sollte die EDTA-Empfindlichkeit von JE 5511 mit modifiziertem Lipoprotein getestet werden.

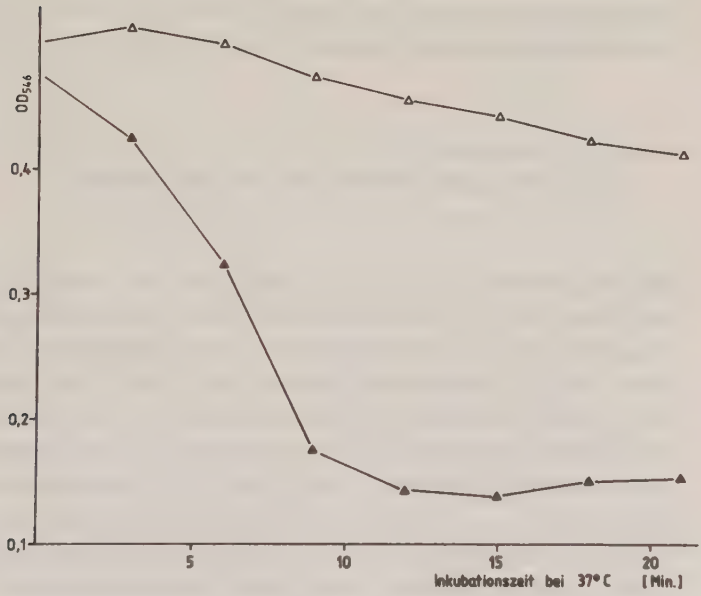


Abbildung 15: Optischer Test mit EDTA/Lysozym.
Zu Wildtypzellen (AB 2847) (-▲-) und Mutantenzellen JE 5511 (-Δ-) in 0,2 M Tris/HCl-Puffer pH 8 mit 0,5 M Sucrose und 0,6 mM EDTA wurden 0,06 mg/ml Lysozym pipettiert. Die Suspension wurde sofort danach 1:1 mit kaltem bidest. Wasser verdünnt. Im Photometer wurde die OD_{546} der Suspensionen in auf 37° C thermostatisierten Küvetten verfolgt und mit einem Schreiber aufgezeichnet.

Dazu wurden Zellen, die bei einer OD_{578} von 0,5 aus 17,5 ml Kultur in Antibiotic Medium 3 (M 3) abzentrifugiert worden waren, einer von WITHOLT beschriebenen EDTA/Lysozymbehandlung mit osmotischem Schock unterzogen (114). Nach dieser Behandlung wurden Aliquots der Zellsuspensionen sofort in auf 37° C thermostatisierten Küvetten im Photometer mit Küvettenwechseleinrichtung überführt.
Abbildung 15 zeigt den zeitlichen Verlauf der optischen Dichte einer Sphäroplastensuspension von Wildtypzellen bei 546 nm. Überraschend fällt die optische Dichte einer Sphäroplastensuspension von Wildtypzellen viel schneller ab als die einer Suspension von Sphäroplasten aus JE 5511. JE 5511-Zellen sind also stabiler gegen eine Behandlung mit EDTA und Lysozym als Wildtypzellen.

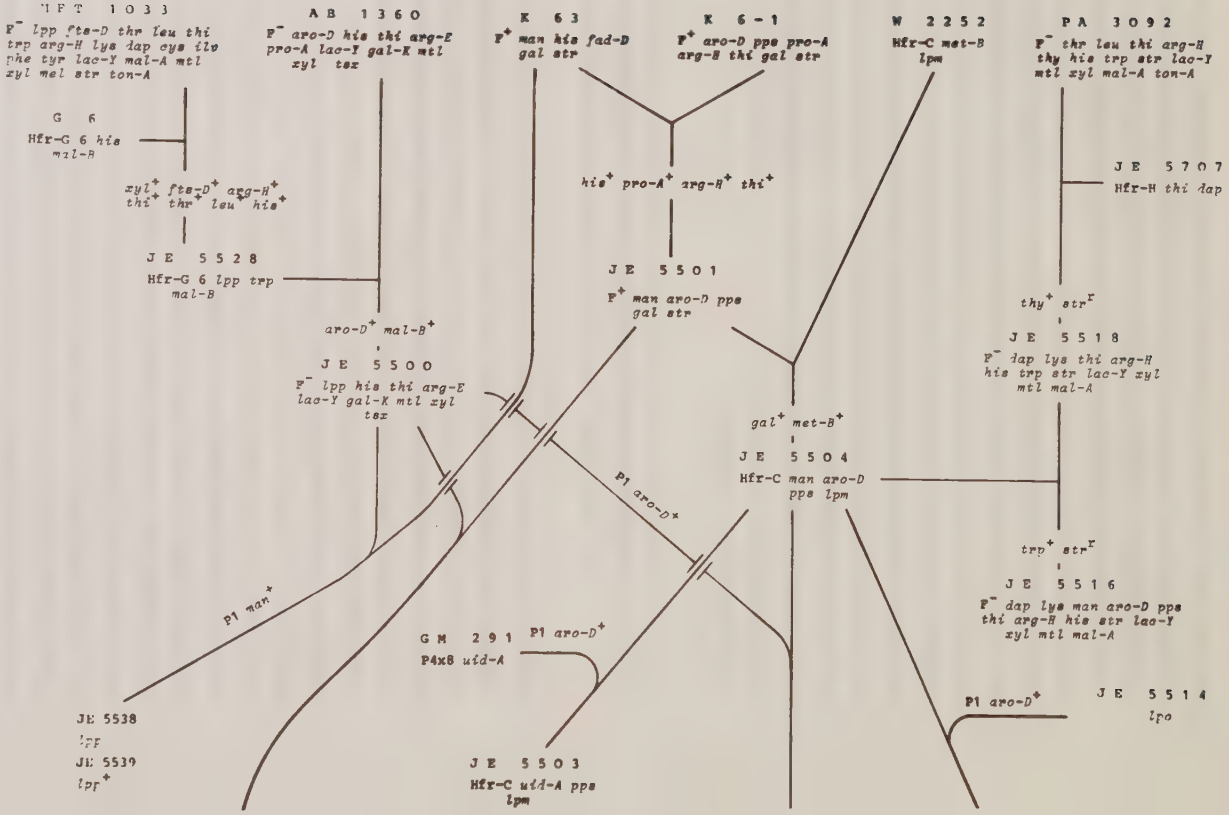
3.8.2.3. Korrelation von optischem EDTA/Lysozymtest mit der lpm-Eigenschaft: Untersuchungen an P 1-Transduktanten

Aus dem Stammbaum in Abbildung 17 ist ersichtlich, daß JE 5511 aus einer P 1-Transduktion des lpp-Genbereichs (vgl. Abbildung 2) von JE 5500, einem ftsD$^+$-Abkömmling von MFT 1033, in den HfrC-Stamm JE 5504 durch Selektion auf aroD$^+$ hervorgegangen ist. JE 5511 verkörpert ebenso wie JE 5537 einen Typ einer Reihe von Transduktanten, die NISHIMURA und HIROTA durch Transduktion des lpp-Genbereichs aus JE 5500 in K 63 und JE 5501 - beides Elternstämme von JE 5504 - in JE 5504 und über JE 5502 lpp in JE 5503, einen man$^+$ aroD$^+$ uidA-Abkömmling von JE 5504, erhielten (106).
Diese Transduktanten und Elternstämme wurden auf ihr Verhalten im optischen EDTA/Lysozymtest untersucht. Dabei zeigte sich, daß alle Transduktanten, bei denen JE 5503 und JE 5504 als Rezipienten fungiert hatten, dasselbe Verhalten im optischen Test aufweisen wie JE 5511. Waren JE 5501 oder K 63 Rezipienten gewesen, zeigen die Transduktanten Wildtypverhalten. K 63 und JE 5501 selbst verhalten sich wie Wiltypstämme, JE 5503 und JE 5504 verhalten sich

wie JE 5511. JE 5504 entstand aus der Kreuzung von JE 5501 F^+ man aroD pps gal str mit W 2252 HfrC metB, wobei auf gal^+ und $metB^+$ selektioniert wurde (vgl. Abbildung 16). W 2252 aus der ersten von HIROTA erhaltenen Stichkultur verhielt sich wie ein Wildtypstamm im optischen Test. Danach wurden von HIROTA drei weitere Stichkulturen erhalten, die im optischen Test alle Mutantenverhalten zeigen. Die zuerst erhaltene Kultur wurde deshalb verworfen und nicht weiter untersucht.
Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß mit Hilfe des optischen Tests das Auftreten bzw. Nichtauftreten eines Merkmals verfolgt werden kann, das von der Peptidmutation im Lipoprotein unabhängig ist und das im Falle des näher untersuchten Stammes JE 5511 mit den fehlenden Diglyceridfettsäuren korreliert.

3.8.2.4. Korrelation von optischem Test mit EDTA/Lysozym mit der lpm-Eigenschaft: Fettsäurebestimmungen

Mit Fettsäurebestimmungen von Lipoprotein aus Stämmen jeder Gruppe der Transduktanten und von deren Elternstämmen, unter denen sowohl lpp^+- wie auch lpp-Stämme waren, sollte geprüft werden, ob eine Korrelation von Mutantenverhalten im optischen Test mit EDTA/Lysozym und fehlenden Diglyceridfettsäuren am Lipoprotein besteht; außerdem sollte die Unabhängigkeit der lpp- und lpm-Mutationen bestätigt werden.
Tabelle 9 enthält die untersuchten Bakterienstämme mit genetischen Merkmalen, das Verhalten im optischen Test und die Zahl der Fettsäuren pro Mol Lipoprotein. Die Tabelle zeigt, daß alle Stämme, die im optischen Test Mutantenverhalten zeigen, eine im Durchschnitt um 1,48 reduzierte Zahl von kovalent gebundenen Lipoproteinfettsäuren aufweisen außer W 2252, bei dem aus drei MMLP-Proben stark streuende Werte bestimmt wurden. Für Lipoprotein aus JE 5511 wurde bei dieser Bestimmung im Durchschnitt 1,3 Fettsäuren pro Mol Lipoprotein bestimmt (Bestimmung in Abschnitt 3.4.


TFT 1033
F⁻ lpp fts-D thr leu thi trp arg-H lys dap cys ile phe tyr lac-Y mal-A mtl xyl mel str ton-A
AB 1360
F⁻ aro-D his thi arg-E pro-A lac-Y gal-K mtl xyl tsx
K 63
F⁺ man his fad-D gal str
K 6-1
F⁺ aro-D pps pro-A arg-H thi gal str
W 2252
Hfr-C met-B lpm
PA 3092
F⁻ thr leu thi arg-H thy his trp str lac-Y mtl xyl mal-A ton-A
G 6
Hfr-G 6 his mal-B
xyl⁺ fts-D⁺ arg-H⁺ thi⁺ thr⁺ leu⁺ his⁺
his⁺ pro-A⁺ arg-H⁺ thi⁺
JE 5707
Hfr-H thi dap
JE 5528
Hfr-G 6 lpp trp mal-B
JE 5501
F⁺ man aro-D pps gal str
thy⁺ str^r
aro-D⁺ mal-B⁺
JE 5518
F⁻ dap lys thi arg-H his trp str lac-Y xyl mtl mal-A
JE 5500
F⁻ lpp his thi arg-E lac-Y gal-K mtl xyl tsx
gal⁺ met-B⁺
JE 5504
Hfr-C man aro-D pps lpm
P1 aro-D^x
P1 man⁺
trp⁺ str^r
JE 5516
F⁻ dap lys man aro-D pps thi arg-H his str lac-Y xyl mtl mal-A
GM 291
P4x8 uid-A
P1 aro-D⁺
P1 aro-D⁺
JE 5514
lpo
JE 5538
lpf
JE 5539
lpf⁺
JE 5503
Hfr-C uid-A pps lpm

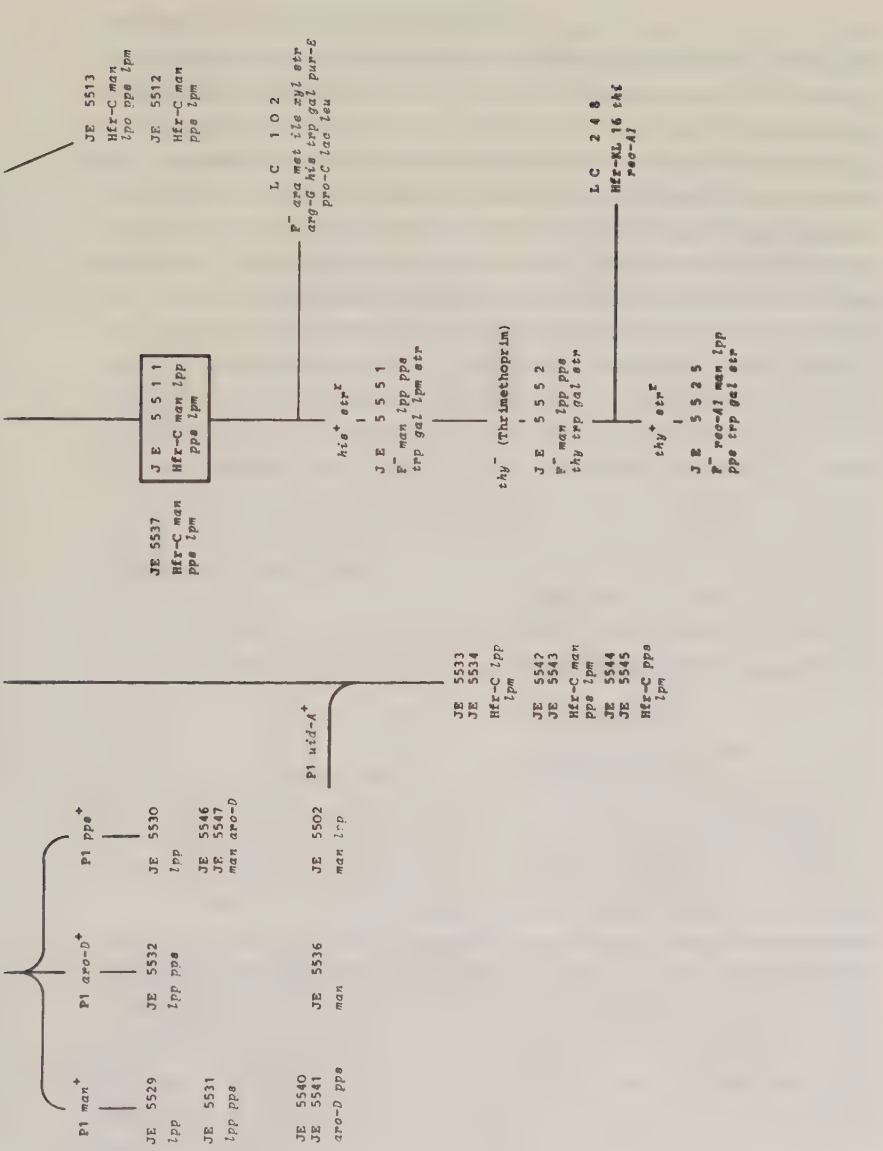


Abbildung 16: Stammbaum von JE 5511 und anderen in dieser Arbeit untersuchten Stämmen von HIROTA. Die aufgeführten Stämme wurden von NISHIMURA und HIROTA isoliert und sind zum Teil in (106) beschrieben. Die vollständige Liste der genetischen Merkmale der untersuchten Stämme findet sich in der Stammliste.

0,76 Mol Fettsäuren/Mol LP), für Lipoprotein aus Wildtyp-zellen 3,06 Mol Fettsäuren pro Mol Lipoprotein (in 3.4. 2,61 Mol Fettsäuren/Mol LP). Die bei diesen Bestimmungen ermittelten Fettsäuregehalte von Lipoprotein aus lpm$^+$- und lpm-Zellen liegen höher als bei der ersten Bestimmung. Dies kann sowohl durch Aufzuchtbedingungen (statt M 9-Minimal-medium wurde bei diesen Versuchen M 3-Vollmedium zur Zell-züchtung verwendet) wie auch durch systematische Abweichun-gen - z.B. Verdunsten von Petroläther aus der Lösung von internem Standard während der Zugabe - bedingt sein.

Tabelle 9: Korrelation von lpm-Phänotyp und optischem EDTA/Lysozymtest

Stamm	Genetische Merkmale	Opt. Test	Mol	FS/Mol	LP	$\bar{x}$
W 2252	HfrC metB	Mut.	1,2 3,1	(1,3) (3,0)	1,6 3,3	
K 63	F$^+$ man his fadD gal str	WT	3,3	2,9		3,2
JE 5501	F$^+$ man aroD pps gal str	WT	3,2	3,0		3,1
JE 5504	HfrC man aroD pps lpm	Mut.	2,0 1,5	(1,8)	1,7	1,8
JE 5503	HfrC uidA pps lpm	Mut.	1,1	1,5		1,3
JE 5511	HfrC man lpp pps lpm	Mut.	1,3	(1,2)	1,5	1,3
JE 5529	lpp aroD pps gal str	WT	3,2	3,3		3,3
JE 5536	man pps gal str	WT	2,9	3,0		3,0
JE 5502	man lpp aroD gal str	WT	2,8	(2,8)		2,8
JE 5533	HfrC lpp pps lpm	Mut.	1,4	1,7		1,6

Die kovalent an MMLP gebundenen Fettsäuren wurden wie in 2.2.10. beschrieben bestimmt. Die zum optischen EDTA/Lysozymtest eingesetzten Zellen stammten von derselben Vorkultur ab, mit der auch die 10 l-Kulturen (M 3) angeimpft wurden, die bei der Fettsäurebestimmung Verwendung fanden. Die Zahlen für den Gehalt an Fettsäuren pro Mol Lipoprotein sind Werte aus Bestimmungen von unabhängig voneinander isolierten Proben von Murein-Lipoprotein-Komplex. Die Werte in Klammern geben die Zahl von Fettsäuren an, die von Aliquots derselben MMLP-Probe, die zur Bestimmung der Fettsäurezahl vor der Klammer Verwendung fand, ermittelt wurde.

Außer bei den für Lipoprotein aus W 2252 bestimmten Werten beträgt die Streuung der Zahl der Fettsäuren pro Mol Lipoprotein desselben Stammes, das aus verschiedenen Fermentatio-

nen aufgearbeitet wurde, nie mehr als ± 0,38 vom Mittelwert bei lpm-Zellen oder ± 0,26 bei Wildtypzellen. Bei zwei oder mehreren Bestimmungen von Aliquots derselben Lipoproteinprobe (Werte in Klammern) reduziert sich die Streuung auf ± 0,1 vom Mittelwert dieser Bestimmungen; in diesen Fällen läßt sich kein signifikanter Unterschied der Streuung zwischen Fettsäurebestimmungen von lpm- und lpm^+-Stämmen feststellen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die genaue Zahl der am Lipoprotein gebundenen Fettsäuren sowohl bei lpm- wie auch bei lpm^+-Zellen nicht konstant sein muß, sondern daß diese Zahl von gewissen äußeren, bisher noch unbekannten Einflüssen abhängig sein kann. Die relativ hohe Streuung der Fettsäurewerte bei geringem Fettsäuregehalt von lpm-Lipoprotein im Vergleich zu Wildtypprotein zeigt außerdem, daß der genetische Block in der Acylierung von Glycerylcystein nicht vollständig ist.
Dagegen ist die starke Streuung der Fettsäurezahl von Lipoprotein aus W 2252 nicht zu erklären, obwohl die aus den von HIROTA erhaltenen Stichkulturen abgeimpften Zellen einheitlich Mutantenverhalten im optischen EDTA/Lysozymtest zeigen.

Faßt man die Ergebnisse der Fettsäurebestimmungen zusammen, so zeigt sich eine Korrelation von lpm (= reduzierte Fettsäurezahl am Lipoprotein) und dem Verhalten im optischen EDTA/Lysozymtest. Unklar bleibt das Verhalten des Stammes W 2252, der bei verschiedenen Fettsäurebestimmungen sowohl lpm- wie auch lpm^+-Phänotyp zeigt, im optischen Test dagegen einheitlich Mutantenverhalten. Weiterhin sind die Mutationen lpm und lpp mit Hilfe des optischen Tests und mit Fettsäurebestimmungen eindeutig voneinander getrennt worden. Es bleibt fraglich, ob die lpm-Mutation mit W 2252 in die Linie JE 5504 - JE 5511 eingebracht wurde oder ob sie durch das Zusammenwirken von zwei latenten Mutationen in JE 5501 und W 2252 nach deren Kreuzung in JE 5504 phänotypisch zur Ausprägung kommt.

3.8.2.5. Versuch zur Isolierung von Lipoprotein-Fettsäuremutanten durch Anreicherung mit EDTA/Lysozymbehandlung (67)

In parallel zu diesen Untersuchungen durchgeführten Experimenten (67) konnte MOLLNER die Versuchsbedingungen beim EDTA/Lysozymtest so variieren, daß nach dem Versuch bei Verdünnungsausstrichen von Wildtypzellen keine überlebenden Zellen verbleiben, während von der lpm-Lipoproteinmutante JE 5504 noch 200 bis 300 Kolonien pro Agarplatte wachsen. MOLLNER benützte dieses Verfahren zur Anreicherung nach Mutagenese und erhielt ein Spektrum von überlebenden Zellen, die deutliche Veränderungen der Zellhülle aufweisen (Zellform, Phagensensitivität, Colicin-Toleranz, Lipidstoffwechsel). Unter diesen Mutanten fand sich ein Stamm (JE 5501/8), an dessen im Peptidteil unverändertes Lipoprotein im Durchschnitt 0,5 bis 1 Fettsäuren weniger gebunden sind als am Lipoprotein des mutagenisierten Ausgangsstamms JE 5501. Zellen von JE 5501/8 bauen außerdem die 3,5-fache Menge an Radioaktivität in Phosphilipide ein, wenn sie mit ^{14}C-Acetat in Acetat-Einbaumedium gezüchtet werden. Diese Ergebnisse können dahingehend interpretiert werden, daß eine Mutation im Phospholipidstoffwechsel unter anderem auch zur Reduktion der Zahl von Lipoproteinfettsäuren führt.

3.8.2.6. Einbau von ^{14}C-Acetat in Lipide von lpm-Zellen

Ein erhöhter Einbau von ^{14}C-Acetat in Phospholipidfettsäuren ist schon bei JE 5511 beobachtet worden (vgl. 3.3.3.). Deshalb wurden Phospholipide von AB 2847, W 3110, K 63, JE 5501, W 2252, JE 5504, JE 5503, JE 5502, JE 5533, JE 5511 und JE 5537 (vgl. Stammbaum in Abbildung 16) mit ^{14}C-Acetat markiert, mit Chloroform/Methanol extrahiert und in Toluolscintillationsflüssigkeit gezählt. Dabei zeigte sich erneut, daß alle Stämme, die aus JE 5504 durch P 1-Transduktion entstanden sind, einen um das Doppelte erhöhten Einbau von ^{14}C-Acetat in Phospholipide (und damit auch

Lipoproteinfettsäuren) aufweisen. Stämme, bei denen K 63 und JE 5501 als Rezipienten fungierten, bauen dieselbe Menge an ^{14}C-Acetat in Phospholipide ein wie die Wildtypstämme AB 2847 und W 3110. W 2252, JE 5504 und JE 5503 selbst zeigen Mutantenverhalten, K 63 und JE 5501 Wildtypverhalten. Der erhöhte Acetateinbau korreliert bei den untersuchten Stämmen mit dem optischen EDTA/Lysozymtest und somit (bis auf W 2252) auch mit dem Auftreten des lpm-Phänotyps.

3.8.2.7. Phagensensitivität von lpm-Zellen

Bakteriophagen reagieren in ihrem Adsorptions- und Infektionsverhalten sehr empfindlich auf Unterschiede im Bau der äußeren Membran von E. coli (17). Deshalb wurde das Verhalten von lpm- und lpm$^+$-Zellen gegenüber den Bakteriophagen T_2, T_4, T_5, Ø 80 und T_7 geprüft. Bei den getesteten Phagen lassen sich bis auf T_2 und T_7 keine Unterschiede zwischen JE 5501 und JE 5504 lpm feststellen. Alle untersuchten Stämme sind sensitiv gegen T_4, T_5 und Ø 80.
Tabelle 10 zeigt das Verhalten von verschiedenen Stämmen bei Infektion mit den Phagen T_2 und T_7. Wurden lpm-Zellen (JE 5504, JE 5511) mit T_2-Phagen ausplattiert, so konnten bei den lpm-Zellen JE 5504 und JE 5511 130 bzw. 108 Lysehöfe, bei den Wildtypstämmen JE 5501 und K 63 300 bzw. 720 Lysehöfe gezählt werden. Beim lpm-Stamm JE 5525 traten 340 Lysehöfe auf.
W 2252 zeigt bei Infektion mit T_2-Phagen kein eindeutiges Verhalten: Beim ersten Versuch fanden sich 83 Lysehöfe auf einer Platte. In zwei weiteren Versuchen, die mit neuen, von Einzelkolonien auf Testplatten abgeimpften Kulturen durchgeführt wurden, konnten in beiden Fällen über 500 Lysehöfe pro Platte gezählt werden.

Tabelle 10: Sensitivität von lpm- und Wildtypstämmen gegenüber den Phagen T_2 und T_7

Stamm	Genotyp	T_2	T_7	Form
E. coli B/r	F^- lpm$^+$ lpp$^+$	+++++	+++	groß
JE 5501	F^+ lpm$^+$ lpp$^+$	+++	+++++	klein
JE 5504	HfrC lpm lpp$^+$	+	++	klein
JE 5525	F^- lpm$^+$ lpp	+++	+++++	groß
K 63	F^+ lpm$^+$ lpp$^+$	++++++	++++	klein
W 2252	HfrC lpm lpp$^+$	+	+++++	groß
		+++++	+++++	groß
		+++++	+++++	groß
JE 5511	HrfC lpm lpp	+	++	klein

Ein Tropfen einer Obernachtkultur wurde in 3 ml Oberschicht-Agar mit Phagen in verschiedener Verdünnung gemischt und ausplattiert. Die Zahl der Lysehöfe wurde bei Platten mit geeigneter Verdünnung bestimmt: $T_2 = 10^{-6}$, $T_7 = 10^{-1}$.
"+" in der Tabelle entspricht je 100 Lysehöfen pro Platte. Da bei T_7-Infektion Lysehöfe unterschiedlicher Größe auftraten, ist dies ebenfalls angegeben.

Bei einem Querstrichtest, bei dem Zellen von JE 5501 und JE 5504 gegen T_7-Phagen ausgestrichen wurden, schienen Zellen beider Stämme gegen diesen Phagen resistent zu sein. Als die Zellen mit diesen Phagen ausplattiert wurden, zeigten sich jedoch stecknadelkopfgroße Lysehöfe auf dem Zellrasen beider Stämme; allerdings in unterschiedlicher Anzahl: Bei JE 5501 betrug die Zahl etwa 500, bei JE 5504 ca. 190. T_7 ist ein Phage, der spezifisch weibliche Zellen infizieren soll (82). Die in Tabelle 10 aufgeführten F^--Zellen, also von E. coli B/r und JE 5525, bilden beim Ausplattieren große, konfluente Lysehöfe mit trüben Rändern. Die F^+-Stämme K 63 und JE 5501 zeigen stecknadelkopfgroße Lysehöfe in großer Zahl, der HfrC-Stamm JE 5504 ebenfalls kleine Lysehöfe in reduzierter Zahl. Alle mit T_7 infizierten Zellrasen von W 2252 HfrC weisen jedoch eine große Zahl von großen Lysehöfen mit trüben Rändern auf.

Nach Kreuzung von JE 5501 mit W 2252, woraus JE 5504 hervorging, nimmt die Sensitivität gegen die Phagen T_2 und T_7 deutlich ab.

3.8.2.8. Globomycinempfindlichkeit von lpm-Zellen

Globomycin ist ein neues Peptidantibiotikum, das eine japanische Forschergruppe aus einem Stamm von Streptomyces halstedii isolieren konnte (56). Dieses Antibiotikum führt zur Zellyse bei E. coli und anderen gram-negativen Bakterien (57). Der genaue Wirkungsmechanismus ist bis jetzt noch nicht aufgeklärt - werden E. coli-Zellen damit behandelt, so kommt es zu einer Anhäufung von Prolipoprotein in diesen Zellen (57). lpo-Zellen, die kein Lipoprotein besitzen sind resistent gegen Konzentrationen von Glybomycin, die im Vergleich zu Wildtypzellen um das Hundertfache höher sind. Werden Globomycin-resistente E. coli-Stämme isoliert und charakterisiert, so finden sich darunter 5 Proz. lpo-Stämme (46). Die Ursache für die Globomycin-Resistenz der übrigen 95 Proz. ist bisher noch nicht bekannt. In einem Plattenquerstrichtest wurde die Globomycin-Sensitivität von lpm-Stämmen getestet.

Tabelle 11: Globomycinsensitivität von lpm-Stämmen

Stamm	Genotyp	Hemmzone
K 63	lpm^+ lpp^+	18 mm
K 6-1	lpm^+ lpp^+	20 mm
JE 5501	lpm^+ lpp^+	17 mm
JE 5504	lpm lpp^+	11 mm
W 2252 a)	$lpm^?$ lpp^+	24 mm
b)	" "	8 mm

0,1 ml einer Lösung, die 10 mg/ml Globomycin in 50 Proz. Äthanol enthielt, wurden mit einer Pipette auf einer Agarplatte ausgestrichen. Quer dazu wurden Bakterien aus einer Flüssigkultur ausgestrichen und bei 37^0 C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Länge der Zone bestimmt, in der keine Bakterien gewachsen waren.

In Tabelle 11 sind die in 3.8.2.3. beschriebenen P 1-Transduktanten nicht aufgeführt. Beim Globomycintest mit diesen Stämmen zeigte sich, daß alle Transduktanten, bei denen JE 5504 oder JE 5503 als Rezipienten fungierten, wie diese Globomycin-resistent sind.
HIROTA isolierte mit Globomycin zwei verschiedene Klone von W 2252 (47). Einer dieser Klone ist F^- - dies kommt durch Resistenz gegen den Phagen Q_β zum Ausdruck - und Globomycin-resistent. Dieser Klon muß also das Hfr-Partikel verloren haben, nicht jedoch die Globomycin-Resistenz, die somit unabhängig vom Geschlecht des untersuchten Stammes sein muß. Ein zweiter Klon von W 2252 ist Q_β-sensitiv - somit HfrC - und stark Globomycin-sensitiv. Da W 2252 aus W 1895 (vgl. Stammbaun von W 2252 in Abbildung 17), einem Q_β-sensitiven und Globomycin-resistenten HfrC-Stamm, durch UV-Bestrahlung zur Reinigung von lysogenen λ-Phagen hervorging, muß es sich bei der zweiten Subpopulation von W 2252 um einen Stamm handeln, dessen Globomycin-Resistenz durch UV-Bestrahlung in starke Globomycin-Sensitivität überging. Die von HIROTA zugesandten Kulturen enthalten beide Subpopulationen (46). Da alle zu Fettsäurebestimmungen verwendeten Kulturen von Einzelkolonien der Testplatten abgeimpft wurden, die zur Prüfung der genetischen Merkmale der Stämme dienten, könnten die zwei Subpopulationen von W 2252 die Ursache für die starke Streuung der Fettsäurewerte von Lipoprotein dieses Stammes sein - Globomycin-sensitive Zellen von W 2252 besitzen Lipoprotein mit drei Fettsäuren, bei Globomycin-resistenten Zellen ist die Zahl der Lipoproteinfettsäuren (auf 1,6) reduziert, so auch bei JE 5504 und allen Abkömmlingen dieses Stammes.
Unklar bleibt vorerst jedoch, daß bei der Kreuzung von W 2252 mit JE 5501, aus der der Globomycin-resistente HfrC-Stamm JE 5504 hervorging, die stark Globomycin-sensitive und Q_β-resistente HfrC-Subpopulation von W 2252 Kreuzungspartner gewesen sein muß, und daß nach der Kreuzung bei JE 5504 HfrC wieder Globomycin-Resistenz auftritt.

Glob.	Stamm	Behandlung	Q_β
s	K 12		r
	↓	Röntgen (bio)	
	58		
	↓	Röntgen (met)	
s	58-161		r
	↓	spont. (bio$^+$ rel)	
s	W 6		s
	↓	Lost (Hfr)	
r	W 1895 HfrC		s
	↓	UV (λ^-)	
a) r	W 2252		a) r
b) ss			b) s

Abbildung 17: Stammbaum von W 2252 HfrC metB (5). Im Stammbaum ist die Globomycin- und Q_β-Sensitivität der einzelnen Stämme angegeben. Diese wurden von NISHIMURA bestimmt. (s = sensitiv; r = resistent)

3.8.2.9. Verhalten von lpm-Zellen bei Behandlung mit Colicin M

Wie Globomycin führt auch Colicin M zur Lyse von E. coli-Zellen oder in osmotisch geschütztem Medium zu Sphäroplastenbildung (22). Es war bekannt, daß JE 5511 schwach tolerant gegenüber Colicin M ist (95). Mit einem Tropftest wurde deshalb die Verdünnungsstufe einer Lösung von Colicin M ermittelt, bei der nach Auftropfen auf einen Zellrasen Lysehöfe auftraten.
Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß über W 2252 eine relativ schwache Colicin M-Toleranz in JE 5504 und JE 5511 eingebracht wurde. Die Hemmhöfe bei W 2252 waren nicht eindeutig definierbar, da sowohl bei unverdünntem Colicin M wie auch bei der 10^{-1}-Verdünnungsstufe die Höfe eine schwächere Trübung als der Zellrasen aufwiesen, aber auch nicht völlig klar waren. Die Colicin M-Toleranz beider Subpopulationen von W 2252 (vgl. 3.8.2.8.) muß noch getestet werden.

Tabelle 12: Colicin M-Sensitivität von lpm-Zellen

Stamm	Genotyp	Verdünnungsstufe von Colicin M
E. coli B/r	lpp^+ lpm^+	10^{-3}
K 63	lpp^+ lpm^+	10^{-3}
JE 5501	lpp^+ lpm^+	10^{-3}
JE 5504	lpp^+ lpm	$10^{-2}/10^{-1}$
JE 5511	lpp lpm	10^{-2}
W 2252	lpp^+ $lpm^?$	unverd./10^{-1}

Verdünnungsstufen einer Colicin M-Stammlösung wurden auf Zellen der untersuchten Stämme in Oberschicht-Agar aufgetropft und über Nacht bei 37° C inkubiert. Als Kontrolle auf $tonA^+$ wurden bei jedem Stamm auch Ø 80- und T_5-Phagen aufgetropft.

3.8.3. Kartierung des mutierten Gens, das dem modifizierten Lipidteil von Lipoprotein (lpm-Phänotyp) bewirkt: Rekombinanten aus JE 5504 lpm und LC 102

Die bisher beschriebenen Versuche zeigen übereinstimmend, daß das lpm-Merkmal im Stamm JE 5504 zum ersten Mal gekoppelt ist mit Mutantenverhalten im EDTA/Lysozymtest, veränderter Phagensensitivität, erhöhtem Einbau von ^{14}C-Acetat in Phospholipide, schwacher Colicin M-Toleranz und Globomycin-Resistenz. Deshalb wurde JE 5504 HfrC man aroD pps lpm mit LC 102 purE proC lac leu ara metA/B ile xyl str argG his trp gal gekreuzt. Nach dieser Kreuzung wurden Rekombinanten isoliert, die jeweils definierte Genbereiche von JE 5504 und LC 102 enthalten. Durch Untersuchen der Eigenschaften dieser Rekombinantenstämme sollte der Genort der lpm-Mutation grob bestimmt und die Korrelation der Mutation mit den in 3.8.2. beschriebenen Eigenschaften von JE 5504 überprüft werden.

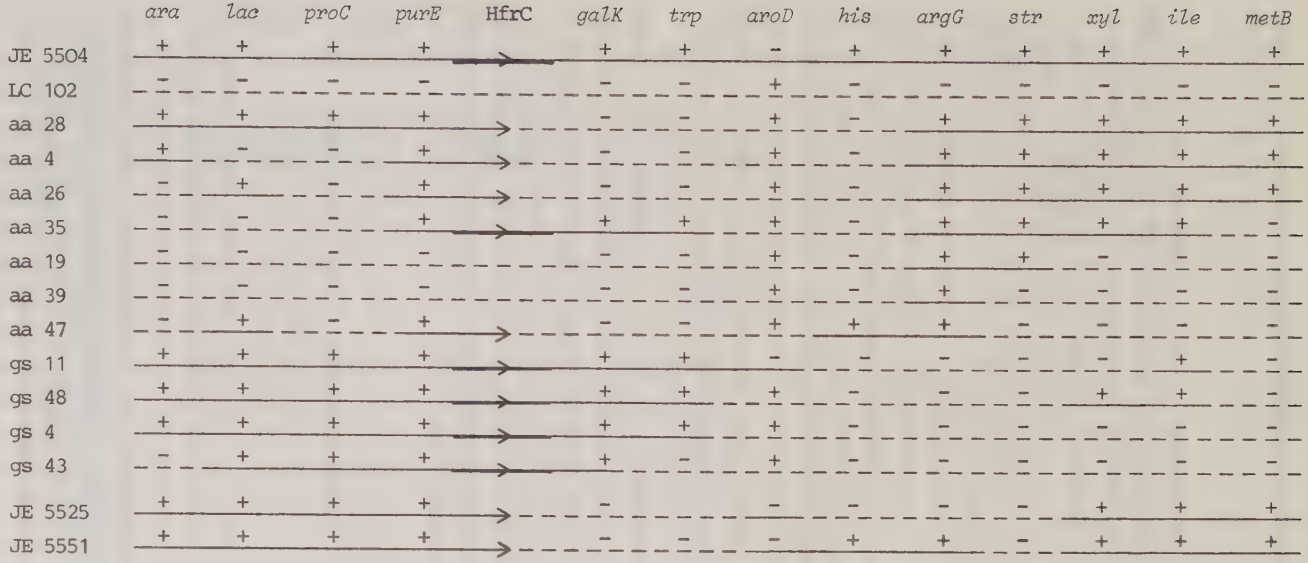


Abbildung 18: Rekombinanten aus den Stämmen LC 102 und JE 5504 lpm.
Die Genbereiche von LC 102 (– –) und JE 5504 (——) und die genetischen Merkmale in den von HIROTA und NISHIMURA isolierten Rekombinanten sind angegeben. Die Verdickung der das Chromosom symbolisierenden Linien soll das integrierte HfrC-Partikel andeuten, wobei der Pfeil die Richtung angibt, mit der der HfrC-Origin das Chromosom bei der Konjugation in die Rezipientenzelle "zieht".

3.8.3.1. Phospholipaseaktivität in ganzen Zellen: Test mit EDTA und Actinomycin

EDTA setzt Lipopolysaccharide aus der äußeren Membran gramnegativer Bakterien frei (7) und aktiviert über diese topologische Veränderung die Phosphilipase A_1 in der Membran (79). Dadurch wird die äußere Membran durchlässig für Substanzen, für die sie normalerweise eine Barriere bildet, so z.B. das lipophile Antibiotikum Actinomycin C. Eine E. coli-Mutante S 17 pldA, in der keine Aktivität von detergenssensitiver und detergensresistenter Phosphilipase A nachzuweisen ist (29), setzt bei Zugabe von EDTA zwar Lipopolysaccharid frei - Actinomycinzugabe zu EDTA-behandelten Zellen von S 17 führt jedoch nicht zum Zelltod (41). Werden die in Tabelle 13 aufgeführten Rekombinanten von JE 5504 und LC 102 mit EDTA und Actinomycin behandelt, so überleben nur solche Stämme, die entweder argG$^+$ oder his$^+$ sind. Der Genort für diese Eigenschaft, durch die diese Zellen zu pldA-Phänotypen werden, liegt also zwischen his und argG auf dem Chromosom von JE 5504 - ein Stamm, der ebenso wie W 2252 eine Behandlung mit EDTA und Actinomycin C überlebt. In demselben Bereich liegt auch die Mutation, die zur Globomycinresistenz von JE 5504 führt. Dieser Bereich ist außerdem verschieden von dem Genort, der für die fehlende Phospholipaseaktivität der Mutante S 17 bei 83 Min. auf dem Chromosom bestimmt wurde (1).

3.8.3.2. Korrelation von Globomycin-Resistenz und EDTA/Actinomycin-Resistenz

Ein Fall, in dem EDTA/Actinomycin-Resistenz und Globomycin-Resistenz nicht korrelieren, ist die Rekombinante aa 19. Dieser Stamm besitzt laut Genkarte nicht den purE-Bereich von JE 5504. Daraus könnte man folgern, daß zum Auftreten von Globomycin-Resistenz zusätzlich zum Bereich his bis argG von JE 5504 noch der purE-Bereich dieses Stammes in den Rekombinanten vorhanden sein muß.

Tabelle 13: Eigenschaften von Rekombinanten aus JE 5504 lpm und LC 102

Stamm	Fettsäuren (Mol/Mol LP) Globomycin	T_2	T_7	Acetateinbau (cpm/10^8 Zellen)	EDTA Lysozym	EDTA Actinomycin	Col M
W 2252	1,6/2,6/3,1/3,2 Gl. res./sens.	++++	+++++ groß	628	Mut.	Mut.	10^{-1}
JE 5501	2,7/2,8/3,1/3,2 Gl. sens.	++++	+++++ klein	352	WT	WT	10^{-3}
JE 5504	1,3/1,6 Gl. res.	-	+ klein	622	Mut.	Mut.	10^{-1}
LC 102	2,9/3,1 Gl. sens.	+++	+++++ groß	420	WT	WT	res.
aa 28	2,0/2,0/1,8 Gl. res.	++++	+++++ groß	498	Mut.	Mut.	10^{-1}
aa 4	1,3/2,8/3,2 Gl. sens.	+	+ klein	n.b.	Mut.	WT	10^{-2}
aa 26	1,9/2,3 Gl. res.	+++++	+++++ groß	507	Mut.	Mut.	10^{-2}
aa 35	2,4/1,8 Gl. res.	+	- klein	695	Mut.	Mut.	res.
aa 19	3,1/2,9 Gl. sens.	+++++	+++++ groß	448	WT	Mut.	res.
aa 39	3,2/2,9 Gl. sens.	+++++	+++++ groß	386	WT	WT	res.
aa 47	2,1/1,4 Gl. sens.	+++	+++++ groß	631	Mut.	Mut.	res.
gs 11	3,3 Gl. sens.	++	+++ klein	805	Mut.	(Mut.)	10^{-1}
gs 48	2,8 Gl. sens.	++	++ klein	605	Mut.	WT	10^{-2}
gs 4	3,1/3,2 Gl. sens.	+	++ klein	623	Mut.	WT	10^{-2}
gs 43	3,0/3,0 Gl. sens.	+	++ klein	742	Mut.	WT	res.
JE 5525	3,2 Gl. sens.	+++	+++++ groß	744	Mut.	WT	10^{-2}
JE 5551	2,2/1,8 Gl. res.	++++	+++++ groß	710	Mut.	Mut.	10^{-1}
AB 2847	3,1 Gl. sens.	n.b.	n.b.	368	WT	WT	n.b.
S 15 pldA$^+$	2,5/2,3 Gl. sens.	n.b.	n.b.	475	Mut.	WT	10^{-2}
S 17 pldA	1,8/1,9 Gl. res.	n.b.	n.b.	571	(Mut.)	Mut.	10^{-1}

Alle in der Tabelle angegebenen Eigenschaften und Werte wurden ermittelt wie in Material und Methoden beschrieben ist. Zu den Fettsäurebestimmungen wurde MMLP verwendet, das von Zellen aus M 9-Minimalmedium isoliert wurde.
(n.b. = nicht bestimmt)

Im Widerspruch dazu stehen die Eigenschaften der Rekombinante gs 11. Dieser Stamm besitzt den kompletten Genbereich purE bis galK von JE 5504, kann eine Behandlung mit EDTA und Actinomycin überleben und ist trotzdem Globomycin-sensitiv. Allerdings ist das Verhalten dieses Stammes im EDTA/Actinomycintest nicht eindeutig: Bei zwei Versuchen wurden nach dem Ausplattieren von EDTA/Actinomycin-behandelten Zellen überlebende Kolonien in deutlich geringerer Anzahl als bei allen anderen EDTA/Actinomycin-resistenten Stämmen gefunden; bei einem weiteren Versuch verhielt sich gs 11 wie ein Wildtypstamm.

3.8.3.3. Korrelation von Globomycin-Resistenz und Fettsäurezahl am Lipoprotein (lpm-Phänotyp)

Bei allen untersuchten Rekombinanten kann man parallel zur Resistenz gegen Globomycin eine Reduktion der Anzahl der kovalent an Lipoprotein gebundenen Fettsäuren beobachten. Bei einer Fettsäurebestimmung (aa 4) wurden für Lipoprotein aus einer ersten Aufarbeitung nur 1,3 Fettsäuren pro Proteinmolekül bestimmt, bei zwei weiteren Aufarbeitungen jedoch 2,8 und 3,2 Mol Fettsäuren pro Mol Protein. Dafür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten: Bei der Proteinisolierung können Fettsäuren verlorengegangen sein oder es lag eine Stammverwechslung vor.

3.8.3.4. Unterscheidung männlicher und weiblicher Rekombinanten durch Bestimmung der Sensitivität gegen T_7-Phagen

T_7 ist ein Bakteriophage, der spezifisch weibliche (F^-) Zellen infiziert (82). Es können jedoch auch F^+-Zellen und Hfr-Zellen mit T_7-Phagen infiziert werden (83). Die Wurfgröße ist in solchen Fällen jedoch stark reduziert, so daß nur kleine, stecknadelkopfgroße Lysehöfe auftreten - ebenso ist, abhängig vom Medium, die Zahl der Lysehöfe geringer

als bei weiblichen Zellen (83). Auf einem Rasen von LC 102-Zellen (F^-) wurden nach T_7-Infektion über 500 große Lysehöfe mit trüben Rändern gezählt, bei JE 5504 HfrC nur 84 kleine Lysehöfe. Betrachtet man die Zahl der Lysehöfe bei Rekombinanten von JE 5504 und LC 102, so zeigt sich, daß nur solche Stämme Lysehöfe in geringer Zahl ergeben, die den purE bis galK-Genbereich von JE 5504 entweder teilweise oder vollständig enthalten. Männliche Stämme (HfrC) sind demnach die Rekombinanten aa 4, aa 35, gs 11, gs 48, gs 4 und gs 43. W 2252 ergab bei diesen Untersuchungen mit T_7-Phagen nur große Lysehöfe. Dies ist darauf zurückzuführen, daß es sich bei den untersuchten Zellen um ein Gemisch beider W 2252-Subpopulationen handelte und deshalb die stecknadelkopfkleinen Lysehöfe der HfrC-Subpopulation in den großen Lysehöfen der Q_β-resistenten Subpopulation nicht mehr erkennbar waren. K 63 und JE 5501 sind F^+-Stämme (vgl. Stammbaum Abbildung 16), die kleine T_7-Lysehöfe in deutlich höherer Zahl zeigen als JE 5504 HfrC und dessen HfrC-Rekombinanten mit LC 102.

3.8.3.5. purE-Genbereich von JE 5504 in den Rekombinanten: Hfr-Origin?

Da die F^--Stämme aa 28, aa 26 und aa 47 $purE^+$ sind und somit diesen Genbereich von JE 5504 tragen, ist es wahrscheinlich, daß der Teil des integrierten Hfr-Partikels, der bei der Konjugation als erster in die weibliche Zelle transferiert wird - der sogenannte Hfr-Origin - zusammen mit dem purE-Genbereich von JE 5504 (dieser folgt auf den HfrC-Origin bei 14 Min. als erstes untersuchtes Merkmal) in diesen Stämmen enthalten ist. Globomycin-Resistenz und damit gekoppelt lpm-Phänotyp können bei weiblichen und männlichen Rekombinanten auftreten; allerdings ist bei allen Globomycin-resistenten weiblichen Rekombinanten mindestens der purE-Genbereich (HfrC-Origin) von JE 5504 zu finden.

3.8.3.6. Optischer Test mit EDTA und Lysozym

Alle purE$^+$-Rekombinanten verhalten sich im optischen Test mit EDTA und Lysozym wie JE 5504, JE 5511 und W 2252. Ein weiterer HfrC-Stamm W 72-6 und der Hfr-Stamm KL 228 zeigen dieses Verhalten ebenfalls. Ein HfrH-Stamm und die Hfr-Stämme KL 14 und KL 16 verhalten sich wie Wildtypstämme, der Colicin M-Produzent CL 139, ein F$^+$-Stamm, zeigt Mutantenverhalten.
Behandelt man die HfrC-Stämme W 2252 und W 72-6 oder den Col M-Produzenten als F$^+$-Stamm mit 0,1 proz. NaDS in 17,5 proz. Sucrose, so lassen sich leicht Einzelkolonien isolieren, die im EDTA/Lysozymtest Wildtypverhalten zeigen (20 bis 30 Proz. der überlebenden Zellen). Da durch diese Behandlung eine Selektion von kurierten Stämmen erfolgen soll (110), die wegen des Fehlens von F-Pili NaDS-unempfindlicher sind als F$^+$- oder Hfr-Zellen, sollte der Genort, der das Verhalten im EDTA/Lysozymtest bestimmt, auf dem Hfr- oder F-Partikel selbst liegen. Dies ist jedoch nur als vorläufiges Ergebnis zu bewerten, da noch keine Phagentypisierung der untersuchten Hfr-Stämme und der kurierten (?) Stämme durchgeführt werden konnte.

3.8.3.7. Wirkung von Spermidin auf Sphäroplastenbildung bei WT-Zellen und EDTA/Lysozym-resistenten Zellen

Im Licht- und Elektronenmikroskop läßt sich kein signifikanter Unterschied in Form und Art der Sphäroplasten aus JE 5501 und JE 5504 Zellen feststellen. In beiden Fällen muß also Lysozym an seinen Wirkort gelangen und die Abrundungen der Zellen durch Verdauen des Mureins bewirken. Anders ist dies im Falle von EDTA und Actinomycin: Bei Zellen, die eine solche Behandlung überleben, kann Actinomycin die Barriere der äußeren Membran mit ihrer hydrophilen Außenschicht nicht überwinden - die lipidreiche Cytoplasmamembran würde kein Hindernis für das lipophile Actinomycin darstellen. Der Schritt, der den "Transport" des Lysozyms

an dessen Wirkort Murein durch die äußere Membran ermöglicht, ist die osmotische Schockbehandlung, der die EDTA-behandelten Zellen nach Zugabe von Lysozym unterzogen werden (114). Beim Verdünnen der mit Sucrose stabilisierten Zellsuspension in Wasser wird das Lysozym von der plötzlich durch die mit EDTA "brüchig" gemachte äußere Membran in das Periplasma einströmenden Flüssigkeit mitgerissen und erreicht dort seinen Wirkort. Durch Zugabe von Spermidin zum bidest. Wasser, das zur Schockbehandlung verwendet wird, läßt sich die Abnahme der optischen Dichte einer Suspension von Wildtypzellen stark verlangsamen bzw. ganz verhindern. Bei Anwesenheit von 1 mM Spermidin in der Sphäroplastensuspension gleichen sich die Kurven von Wildtyp-Sphäroplasten mit Spermidin und die Kurven von Mutantensphäroplasten mit oder ohne Spermidin. Spermidinzugabe kann jedoch weder das Abrunden von Wildtyp- noch von Mutantenzellen verhindern. Spermidin stabilisiert also Sphäroplasten von Wildtypzellen nur gegen die Wirkung von EDTA, nicht jedoch ganze Zellen gegen das Eindringen von Lysozym, das beim optischen EDTA/Lysozymtest durch osmotischen Schock in das Periplasma gelangt.

3.8.3.8. Ist für die Ausprägung des lpm-Phänotyps das Zusammenwirken zweier mutierter Gene erforderlich?

Alle untersuchten Globomycin-resistenten lpm-Stämme besitzen den purE- und den argG-Genbereich von JE 5504. Da bisher kein Stamm ohne purE-Bereich (HfrC-Origin) von JE 5504 mit vollständigem argG bis his-Chromosomenabschnitt von JE 5504 untersucht werden konnte, muß vorläufig offenbleiben, ob dieser letztere Bereich von JE 5504 allein zur Ausprägung des lpm-Phänotyps führen kann. Als Indiz für das Zusammenwirken der purE- und argG-Genbereiche von JE 5504 bei der Ausprägung des lpm-Phänotyps kann das Verhalten der Rekombinante aa 19 dienen: Diese ist EDTA/Actinomycin-resistent und Globomycin-sensitiv und stellt damit die einzige Ausnahme dar bezüglich der sonst bei allen Rekombinanten

festgestellten Korrelation von Globomycin-Resistenz und pldA-Phänotyp. aa 19 besitzt den argG-Bereich, nicht jedoch den purE-Genbereich von JE 5504. Ein weiteres Indiz, das für die Mitwirkung des purE-Genbereichs bei der Ausprägung des lpm-Phänotyps spricht, ist aus dem Stammbaum von W 2252 (Abbildung 17) zu entnehmen. Globomycin-Resistenz tritt zum ersten Mal im HfrC-Stamm W 1895 auf. Dieser Stamm ging aus einem Globomycin-sensitiven Stamm W 6-1 hervor durch Insertion des Hfr-Partikels in das Chromosom. Zusammen mit dieser Insertion kommt es zur Ausprägung der Globomycin-Resistenz im Stamm W 1895. Als drittes Indiz für das Zusammenwirken der zwei Gene bei purE und argG soll das Verhalten von W 2252 angeführt werden. Dieser Stamm ist immer EDTA/Lysozym-resistent und somit sind beide Subpopulationen im purE-Genbereich mutiert. MOLLNER konnte zeigen, daß die optische Dichte einer Sphäroplastensuspension aus 50 Proz. JE 5501 Zellen und 50 Proz. JE 5504 Zellen genau so schnell abfällt wie die einer Suspension von Sphäroplasten aus JE 5501 Zellen (67). Das Merkmal muß also wegen des eindeutigen Mutantenverhaltens von W 2252 im EDTA/Lysozymtest in beiden Supopulationen sauber vorliegen. Die Q_β-resistente und Globomycin-resistente Subpopulation hat das ins Chromosom integrierte F-Plasmid ganz (falls EDTA/Lysozymresistenz nahe beim Plasmid kartiert) oder teilweise (falls EDTA/Lysozymresistenz auf dem HfrC-Origin kartiert) verloren. EDTA/Lysozym-Resistenz und pldA-Phänotyp sind dabei erhalten geblieben und damit auch die Globomycin-Resistenz. Die zweite Subpopulation von W 2252 ist Q_β-sensitiv (HfrC), muß jedoch durch die mit UV-Bestrahlung bewirkte Desintegration der lysogenen λ-Phagen ein Stück des Chromosoms verloren haben oder, was wahrscheinlicher ist, zusätzlich mutiert worden sein. Diese Mutation hat zu starker Globomycinsensitivität dieser Subpopulation geführt. Bei der Kreuzung dieser Subpopulation von W 2252 mit JE 5501 (Abbildung 19) ist dieses mutierte Gen intakt von JE 5501, der purE-Bereich (HfrC) und argG-Bereich dagegen von W 2252 übernommen worden; dies hat beim Kreuzungsprodukt JE 5504 zum erneuten Auftreten von Globomycin-Resistenz geführt.

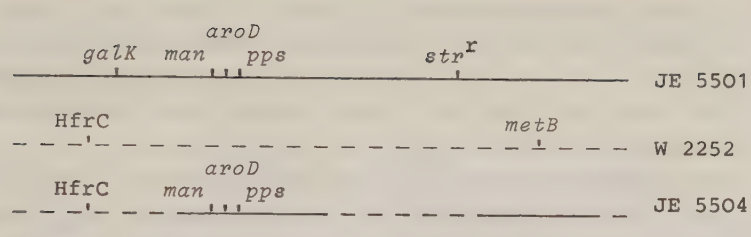


Abbildung 19: Kreuzung von JE 5501 mit W 2252

3.8.3.9. Infektion mit T_2-Phagen

T_2-Resistenz wird nur bei den männlichen Rekombinanten aa 4, aa 35, gs 11, gs 48, gs 4 und gs 43 beobachtet. W 72-6, ein anderer HfrC-Stamm, ist völlig T_2-resistent, was auf das Fehlen des Matrixproteins zurückzuführen ist (50). Gelelektrophoresen von äußerer Membran des Stammes JE 5504 zeigen, daß dieser Stamm Matrixprotein enthält (vgl. 3.9.1.2.). Die Ursache für das Auftreten von T_2-Resistenz ist deshalb noch nicht bekannt, eventuell könnte verändertes Lipopolysaccharid dafür verantwortlich sein. Die verminderte T_2-Sensitivität korreliert nicht mit der lpm-Eigenschaft und wird deshalb nicht von modifiziertem Lipoprotein von lpm-Stämmen hervorgerufen, wie bei der ersten Beobachtung vermutet wurde.

3.8.3.10. Acetateinbau in Phospholipide

Alle untersuchten Rekombinantenstämme, die im EDTA/Lysozymtest Mutantenverhalten zeigten, bauen auch größere Mengen von im Medium angebotenem ^{14}C-Acetat in Phospholipidfettsäuren ein. Im Gegensatz zur EDTA/Lysozymresistenz bleibt diese Eigenschaft in allen Sucrose/NaDS-behandelten Zellen von W 2252 erhalten. Der Genort muß deshalb zwischen purE und dem Gen, das die EDTA/Lysozymresistenz verursacht, auf dem Chromosom von W 2252 bzw. JE 5504 liegen.

3.8.3.11. Zusammenfassung

Aus Tabelle 13 lassen sich folgende Korrelationen erkennen:

- Bei allen untersuchten Stämmen korrelieren Globomycin-Resistenz und lpm-Phänotyp.
- Der lpm-Phänotyp tritt bei den Rekombinanten immer dann auf, wenn der Genbereich his bis argG und der purE-Genbereich von JE 5504 stammt.
- Im his bis argG-Genbereich muß der Ort einer Mutation liegen, die zu verminderter *in vivo*-Aktivität von Phospholipase A_1 führt, was durch die EDTA/Actinomycinresistenz der Zellen mit diesem Genbereich von JE 5504 deutlich gemacht wird.
- Der purE-Genbereich von JE 5504, der ein mutiertes Gen enthält, das phänotypisch durch erhöhte Acetataufnahme der Zellen mit diesem Bereich in Erscheinung tritt, und der mit hoher Wahrscheinlichkeit auch den HfrC-Origin einschließt, führt bei allen Stämmen zu Mutantenverhalten im optischen EDTA/Lysozymtest.
- EDTA/Lysozymresistenz und Acetataufnahme sind unabhängige Eigenschaften, da nur erstere durch NaDS/Sucrosebehandlung von W 2252-Zellen verlorengehen kann.
- Die Untersuchungen mit T_7-Phagen machen deutlich, daß sowohl weibliche wie auch männliche Zellen modifiziertes Lipoprotein enthalten können.
- Da zur Zeit der Untersuchungen keine geeigneten Stämme zur Verfügung standen, muß offenbleiben, ob zur Ausprägung des lpm-Phänotyps in den Rekombinanten das Zusammenwirken der purE- und argG-Genbereiche von JE 5504 notwendig ist.
- Die verminderte T_2-Sensitivität kann auf den integrierten HfrC-Partikel zurückgeführt werden.
- Über den Ort der Mutation, die zum Auftreten einer schwachen Toleranz gegen Colicin M führt, wurde keine Aussage gemacht, da die Colicin M-Resistenz von LC 102 dies unmöglich macht. Bei allen Stämmen, bei denen eine Bestimmung möglich war, fällt Colicin M-Toleranz mit EDTA/Lysozymresistenz und erhöhter Acetataufnahme zusammen.

Folgende Anordnung der Gene im purE bis galK-Genbereich von JE 5504 wird aufgrund dieser Untersuchungen vorgeschlagen:

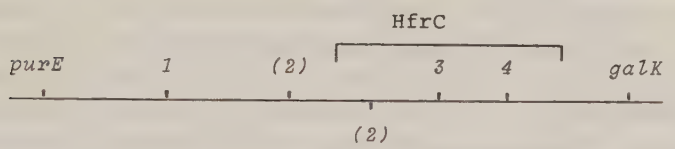


Abbildung 20: Gene im purE bis galK-Genbereich von JE 5504. Gen 1: Erhöhte Acetataufnahme; Gen 2: EDTA/Lysozymresistenz; Gen 3: verminderte T_2-Sensitivität; Gen 4: Infektionsverhalten von T_7. Die aus der Abbildung ersichtlichen Abstände der Gene entsprechen nicht den wirklichen Abständen, es soll nur die Reihenfolge der Gene für die untersuchten Eigenschaften angegeben werden.
Da noch nicht eindeutig geklärt ist, ob Gen (2) Teil des HrfC-Partikels ist oder ob es mit diesem beim Kurieren verlorengehen kann, sind zwei mögliche Genorte angegeben.

3.9. Biochemische Untersuchungen an lpm-Mutanten

3.9.1. Trennung von äußerer Membran und Cytoplasmamembran der Stämme JE 5501 und JE 5504 nach der Methode von OSBORN (77)

Folgende Fragen sollten mit einer Membrantrennung bei einem Wildtyp- und lpm-Mutantenstamm geklärt werden:

- Bei Einbauversuchen mit ^{14}C-Acetat (3.3.3.) hatte sich gezeigt, daß JE 5504 ca. 14 Proz. mehr Phospholipide enthält als JE 5501. Mit der Membrantrennung von ^{14}C-Acetat-markierten Zellen könnte untersucht werden, ob Cytoplasmamembran und äußere Membran gleichermaßen mehr Lipid enthalten oder ob es innerhalb einer dieser Membranen zur Anreicherung von Lipid kommt.
- Bei Untersuchungen mit den Bakteriophagen T_2 und T_7 hatten sich Unterschiede im Infektionsverhalten bei Wildtyp-

und lpm Zellen gezeigt. Durch Vergleich der Proteinmuster beider Membranen von Wildtyp- und Mutantenzellen sollte sich zeigen, ob eventuell Unterschiede im Proteinmuster oder Proteingehalt zu erkennen sind.

Zellen aus je 100 ml Kultur von JE 5501 und JE 5504 (OD_{578} 0,39 bzw. 0,46) in Acetat-Einbaumedium (0,2 µCi ^{14}C-Acetat/ml) wurden abzentrifugiert und in je 500 ml kaltem M 3-Medium resuspendiert und bis zu einer OD von etwa 0,5 weiterinkubiert. Die Zellen wurden abgeerntet und einer Membrantrennung nach OSBORN (77) unterzogen.

Beim Betrachten des Bandenmusters nach Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation von Membranen aus JE 5501 und JE 5504 konnten folgende Unterschiede beobachtet werden: Die H-Banden beider Stämme waren stärker als bei anderen Stämmen üblich, wobei die H-Bande von JE 5504 noch etwas größer war als die von JE 5501. Die L_1-Bande von JE 5501 und die M-Bande von JE 5504 waren stärker als die entsprechenden Bande des jeweils anderen Stammes. Die M-Banden wurden verworfen. Die L_1- und L_2- und die H-Banden wurden nach Waschen in je 0,3 ml bidest. Wasser aufgenommen und eingefroren.

3.9.1.1. Verteilung der ^{14}C-Radioaktivität in den einzelnen Membranen

Die Proteinkonzentrationen in den einzelnen Membransuspensionen wurden mit dem Lowry-Test bestimmt (59). Die ^{14}C-Radioaktivität wurde nach der Folch und Lees-Methode (31) aus Aliquots der Suspensionen extrahiert, gezählt und auf identische Proteinkonzentrationen umgerechnet. Beim Vergleich der Radioaktivität aus Gesamtmembranen von JE 5504 und JE 5501 ergab sich ein Verhältnis von 1,92 : 1; dies entspricht nahezu dem auf identische Zellmassen bezogenen Verhältnis von 2,3 : 1 für aus ganzen Zellen extrahierte Lipide (3.3.3.). Beim Vergleich der Verhältnisse $cpm_{\text{äußere Membran}} : cpm_{\text{Cytoplasmamembran}}$ (JE 5501: 0,59; JE 5504: 0,73) von lpm- und Wildtypstamm wird deutlich,

daß die äußere Membran von JE 5504 23 Proz. mehr Lipid enthält in Relation zu JE 5501.

3.9.1.2. Proteine von äußerer Membran und Cytoplasmamembran aus lpm-Mutante und Wildtypzellen

NaDS-Slab-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach LAEMMLI (58) wurde dazu benützt, eventuelle Unterschiede im Proteinmuster der äußeren Membran oder Cytoplasmamembran von JE 5501 oder JE 5504 aufzufinden. Abbildung 21 zeigt Gelelektrophoresen von äußerer Membran aus JE 5501 (A) und JE 5504 (B), von Cytoplasmamembran aus JE 5501 (C) und JE 5504 (D). Das Proteinmuster der äußeren Membranen beider Stämme ist identisch. Insbesondere im Bereich der Hauptproteine sind Unterschiede weder in der Menge noch im Mengenverhältnis der Proteine I_a und I_b zu erkennen. Die reduzierte T_2-Sensitivität von JE 5504 wird also nicht durch Fehlen des Rezeptors in der äußeren Membran verursacht, sondern muß andere Gründe haben.
Lediglich im Proteinmuster der Cytoplasmamembran lassen sich Unterschiede erkennen (Pfeile). Die Bande eines Proteins im Molekulargewichtsbereich von etwa 80 000 Dalton ist bei JE 5504 deutlich schwächer ausgeprägt als bei JE 5501. Statt dessen tritt im Bereich von etwa 50 000 Dalton in der Cytoplasmamembran von JE 5504 eine Bande auf, die bei JE 5501 nicht auftritt.

3.9.1.3. Lipopolysaccharidbestimmung

Mit einer Bestimmung von 2-Keto-3-desoxy-octonsäure (KDO) wurde der Lipopolysaccharidgehalt von äußerer Membran der Stämme JE 5501 und JE 5504 ermittelt. Äußere Membran von JE 5501 enthält 0,013 µM KDO/mg Protein, was 0,026 mg LPS/mg Protein entspricht. Äußere Membran von JE 5504 enthält 0,01 µM KDO/mg Protein, was 0,02 mg LPS/mg Protein entspricht.

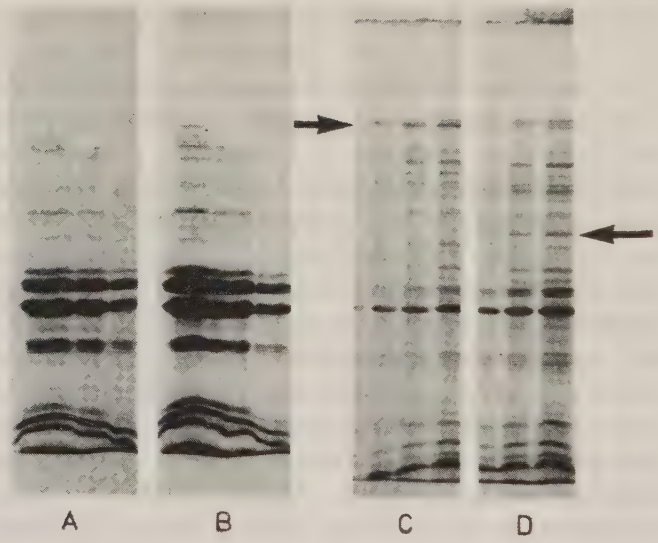


Abbildung 21: Proteinmuster der äußeren Membran und der Cytoplasmamembran von JE 5501 und JE 5504. Membranen von Zellen beider Stämme wurden nach der Methode von OSBORN (77) getrennt. Aliquots der H-Banden von JE 5501 (A) und JE 5504 (B) und der L-Banden von JE 5501 (C) und JE 5504 (D) wurden auf ein NaDS-Slab-Gel nach LAEMMLI (58) aufgetragen und elektrophoretisiert. Die Banden der getrennten Proteine wurden mit Coomassie Brillant Blue nach der Methode von Fairbanks (30) angefärbt.

Die äußere Membran von JE 5504 enthält nach KDO-Bestimmung 13 Proz. weniger Lipopolysaccharid als die äußere Membran von JE 5501.

3.9.1.4. Zusammenfassung

In der äußeren Membran von JE 5504 kommt es im Vergleich zu JE 5501 zu folgenden Veränderungen:

- Der Lipidgehalt ist um ca. 20 Proz. erhöht.
- Der Lipopolysaccharidgehalt ist um ca. 13 Proz. reduziert.

Im Proteinmuster der äußeren Membran von JE 5504 läßt sich kein Unterschied zu JE 5504 feststellen, mit dem die verminderte T_2-Sensitivität zu erklären wäre. Die Ursache dafür könnte allerdings im reduzierten Lipopolysaccharidgehalt der äußeren Membran von JE 5504 liegen, da T_2-Phagen zur Infektion Lipopolysaccharid und Rezeptorprotein des Bakteriums benötigen. Die Korrelation dieser Eigenschaften und des veränderten Proteinmusters der Cytoplasmamembran mit dem lpm-Phänotyp muß durch Untersuchungen an Rekombinanten bestätigt werden.

3.9.2. CMP-Transport bei Wildtyp JE 5501, lpm-Mutante JE 5504 und Kontrollstämmen

Die äußere Membran von E. coli wirkt bei der Diffusion von ungeladenen und hydrophilen Molekülen als ein Molekularsieb mit einer Ausschlußgrenze, die bei 600 - 700 Dalton für Saccharide und Oligopeptide liegt (64, 72). Bis jetzt konnte gezeigt werden, daß zumindest eines der Hauptproteine von E. coli eine Pore bildet, die die Diffusion kleiner hydrophiler Substanzen durch die äußere Membran ermöglicht (70, 71). Dieses Protein besteht bei E. coli B aus I_a, bei E. coli K 12 aus den Species I_a und I_b, und entspricht dem Matrixprotein (70, 71, 88). Es ist nach außen derart exponiert, daß es die Funktion als Rezeptor für den Phagen T_2 einnehmen kann (28, 38); nach innen bindet es mit dem Murein nicht-kovalent (61, 116).
Zwischen Lipoprotein und Matrixprotein besteht eine Interaktion (61). Wahrscheinlich bilden Matrixprotein und Protein I_b, die nach dem Regulationsgen auch ompB-regulierte Proteine genannt werden (98), zusammen mit Lipoprotein als Komplex eine hydrophile Pore, wobei das Lipoprotein als stabilisierender Faktor wirken soll (87).
Mehrere Arbeitsgruppen konnten auf verschiedenen Wegen beweisen, daß Nucleosidmonophosphate durch die Pore, die von

den ompB-regulierten Proteinen gebildet wird, von der Zelle aufgenommen werden (4, 60, 98, 115). Mit einem CMP-Transportversuch sollte deshalb geklärt werden, ob der ompB-Protein/Lipoprotein-Komplex in der lpm-Mutante in funktioneller Form vorliegt.
Abbildung 22 zeigt das Ergebnis eines Transportversuchs mit CMP, der mit den Stämmen JE 5501, JE 5504, W 2252 und den Kontrollstämmen AB 2847, W 72-6 HfrC und H 306 T2h^r durchgeführt wurde.

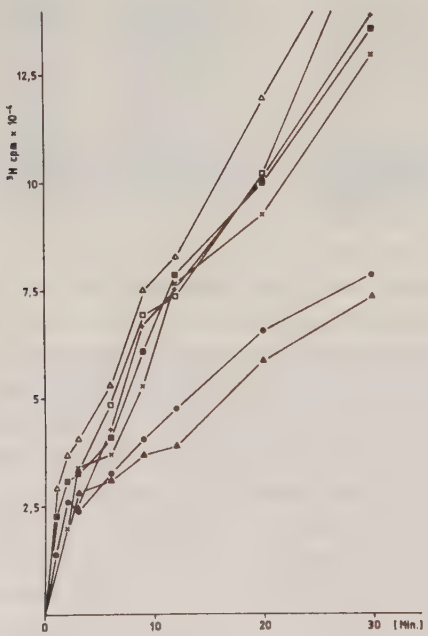


Abbildung 22: 5'CMP-Aufnahme von lpm-Mutante und Kontrollstämmen.
Zellen von AB 2847 (-x-+-), JE 5501 (-□-), W 2252 (-Δ-), JE 5504 (-■-), H 306 T2h^r (-●-) und W 72-6 HfrC (-▲-) wurden in M 9-Medium ohne Supplemente suspendiert und mit 8 µCi/ml (0,62 nM/ml) ^{3}H-CMP versetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden 0,1 ml Proben entnommen, abfiltriert und gewaschen. Die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität wurde bestimmt.

Nur die beiden Mutantenstämme W 72-6 und H 306 weisen eine signifikante Reduktion der Aufnahme von ^{3}H-Radioaktivität (CMP) in die Zellen auf. Durch die Reduktion der Fettsäurezahl bei Lipoprotein aus JE 5504 wird die Funktion der hydrophilen Pore aus Matrixprotein und Lipoprotein nicht beeinträchtigt. Genetische Untersuchungen (3.8.3.9.) hatten gezeigt, daß partielle T_2-Resistenz und lpm-Phänotyp nicht miteinander korrelieren.
Durch die Untersuchung der T_2-Sensitivität und des CMP-Transports von lpm-Mutanten (JE 5504) ließen sich keine Hinweise auf das funktionelle Zusammenwirken von Lipoprotein und Matrixprotein als Rezeptor für den Phagen T_2 und bei der Bildung hydrophiler Poren durch die äußere Membran gewinnen.

3.9.3. Untersuchungen zur Biochemie des EDTA/Lysozymtestes

Bei den genetischen Untersuchungen hatte sich gezeigt, daß lpm-Zellen stabiler gegen eine Behandlung mit EDTA und Lysozym sind als Wildtypzellen (3.8.2.2.). MOLLNER konnte zeigen (67), daß bei entsprechenden Bedingungen Sphäroplasten aus Mutantenzellen - im Gegensatz zu Sphäroplasten aus Wildtypzellen - überleben können. Unklar war jedoch geblieben, wie der unterschiedliche Verlauf der Absorptionskurven bei 546 nm zustandekommt. Um dies zu klären, wurden zwei Experimente durchgeführt: Im ersten Experiment wurde die Verteilung von Lipid in Sphäroplasten und im 8000 g Überstand nach 5 Min. Zentrifugation zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von EDTA und Lysozym untersucht. In einem zweiten Experiment wurde Gesamtlipid aus Sucrosemedium und Sphäroplasten nach verschiedenen Inkubationszeiten dünnschichtchromatographisch getrennt und auf Abbauprodukte untersucht.

3.9.3.1. Freisetzung von Lipiden in das Medium während Zellwachstum und bei EDTA/Lysozymbehandlung

0,2 ml Übernacht-Vorkultur der zu untersuchenden Stämme in kaltem Acetat-Einbaumedium wurde zum Animpfen von Kulturen in 20 ml Acetat-Einbaumedium mit 0,25 µCi ^{14}C-Acetat/ml verwendet. Die Zellen wurden bei einer OD_{578} von 0,2 aus dem Einbaumedium abzentrifugiert und in 100 ml kaltem M 3-Medium resuspendiert. Bei Erreichen einer OD_{578} von 0,25 wurden diese Zellen abgeerntet und einer EDTA/Lysozymbehandlung analog zum optischen Test unterzogen.
In Tabelle 14 und Abbildung 23 ist das Ergebnis eines Experiments mit den Stämmen JE 5501 und JE 5504 wiedergegeben, bei dem ins Medium freigesetzte Lipide bei Zellwachstum und EDTA/Lysozymbehandlung bestimmt wurden. Untersuchungen mit den Stämmen JE 5502 (WT) und JE 5537 lpm bzw. JE 5511 lpm brachten identische Ergebnisse.

Tabelle 14: Einbau von ^{14}C-Acetat in Zellen und Lipide und Freisetzung von ^{14}C-markierten Lipiden ins Medium bei den Stämmen JE 5501 und JE 5504 lpm

Zeitpunkt	Radioaktivität in	JE 5501	JE 5504
sofort nach Verdünnen in kaltes M 3-Medium	Zellen und Medium extrahiert/OD 0,1	33,84 cpm x 10^4	61,71 cpm x 10^4
	Zellen extrahiert /OD 0,1	22,67	46,13
bei Abernten für EDTA/Lysozymbehandlung	Zellen und Medium nicht extrahiert	52,03	131,47
	Zellen und Medium extrahiert/OD 0,1	8,79	15,59
	Zellen extrahiert /OD 0,1	5,71	12,54
nach Abernten	Medium extrahiert /OD 0,1	0,54	0,41
nach EDTA/Lysozymbehandlung	Sphäroplasten extrahiert/OD 0,1	4,79	9,97

Aliquots der aufgeführten Proben wurden entnommen, wenn angegeben extrahiert (31), und gezählt. Die so ermittelte Radioaktivität wurde über das Volumen der gemessenen Probe auf den Gesamtgehalt an Radioaktivität hochgerechnet und zur besseren Vergleichbarkeit auf OD_{578} = 0,1 bezogen angegeben. Die Tabelle zeigt das Ergebnis eines Experiments, das insgesamt viermal durchgeführt wurde und analoge Ergebnisse erbrachte.

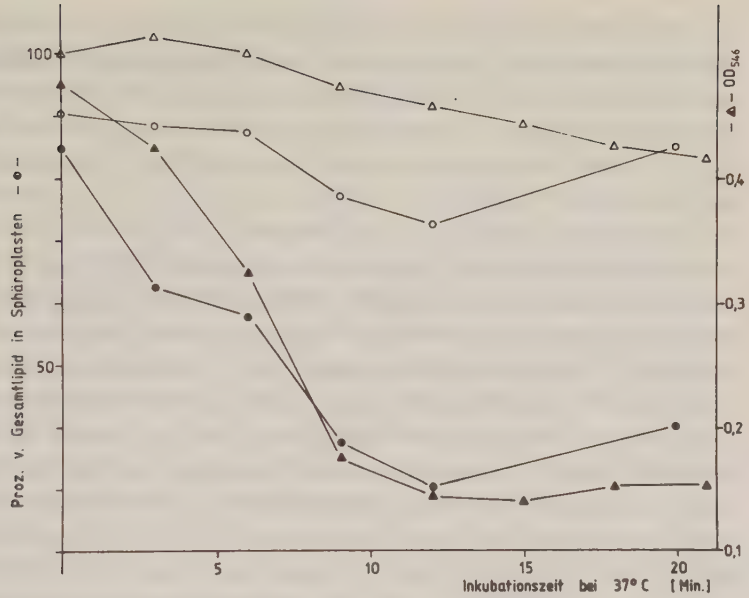


Abbildung 23: Abnahme von ^{14}C-Lipidradioaktivität im 8000 g Sediment (-●-) und Abnahme der optischen Dichte (-▲-) von Suspensionen von Sphäroplasten aus Zellen der Stämme JE 5501 (-●-▲-) und JE 5504 (-o-Δ-).

Die vor EDTA/Lysozymbehandlung aus JE 5504 extrahierten Lipide enthalten um den Faktor 2,19 mehr Radioaktivität als die Lipide von JE 5501. Berücksichtigt man den um 14 Proz. erhöhten Lipidgehalt der Zellen von JE 5504 (3.3.2.), so ist in diesem Falle die spezifische Markierung der Lipide aus JE 5504 um den Faktor 1,92 erhöht. Mit diesem Faktor läßt sich berechnen, daß JE 5504 während des Wachstums in kaltem M 3-Medium durchschnittlich 70 Proz. weniger Chloroform/Methanol-extrahierbare Lipide ausscheidet als JE 5501.

Von den bei 37° C inkubierten Sphäroplasten wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und in einer Eppendorf-Zentrifuge 5 Min. bei 8000 g zentrifugiert. Die aus dem Sediment bestimmte Radioaktivität von Sphäroplasten aus

JE 5501 und JE 5504 wurde zusammen mit der in anderen Versuchen ermittelten Abnahme der optischen Dichte gegen die Zeit aufgetragen. Aus Abbildung 23 kann man erkennen, daß der Verlauf dieser Kurven nahezu parallel ist - lediglich bei längerer Inkubation bei 37° C steigt der Lipidgehalt der Sedimente leicht an.
Dieser Versuch zeigt, daß mit dem optischen Test die Lyse von Sphäroplasten aus Zellen der Stämme JE 5501 und JE 5504 verfolgt werden kann. Intakte Sphäroplasten lassen sich bei 8000 g sedimentieren; ausgelaufene, lysierte Partikel verbleiben im Überstand (Mikroskop). Der Anstieg von sedimentierter ^{14}C-Radioaktivität nach längerer Inkubationszeit kann mit der beginnenden Aggregation von lysiertem Material erklärt werden. So enthält eine Suspension von Sphäroplasten aus JE 5501 nach 20 Min. relativ viele lysierte Sphäroplasten, und es kommt parallel zum Ansteigen der Radioaktivität im Sediment auch zu einem leichten Ansteigen der optischen Dichte. In Suspensionen von JE 5504 kann dieses Ansteigen der optischen Dichte wegen der großen Zahl der intakten Sphäroplasten zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht erkannt werden.

3.9.3.2. Abbau von Lipiden während der Inkubation von Sphäroplasten aus Wildtyp- und lpm- und pldA-Mutantenzellen bei 37° C

Um zu prüfen, ob die Lyse von Sphäroplasten aus Wildtypzellen durch Phospholipidabbau verursacht wird, wurden Aliquots von Sphäroplasten aus Zellen der Wildtypstämme JE 5502 und S 15 und der Mutantenstämme JE 5511 lpm und S 17 pldA zusammen mit dem Medium nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 37° C mit Chloroform/Methanol (31) extrahiert. Die extrahierten Lipide aus den Sphäroplastensuspensionen wurden mit dem Laufmittelsystem II auf Dünnschichtplatten getrennt und ausgekratzt, um die Radioaktivität der einzelnen Komponenten zu bestimmen.

In Abbildung 24 sind die prozentualen Anteile von Phosphatidyläthanolamin-Radioaktivität (A), Fettsäure-Radioaktivität (B) und Phosphatidylglycerin-Radioaktivität (C) von der Summe der Radioaktivität dieser drei auf den Chromatogrammen identifizierten Komponenten aufgetragen. Folgendes Verhalten der einzelnen Komponenten kann aus Abbildung 24 entnommen werden:

- Phosphatidyläthanolamin (PEA) wird bei JE 5511 lpm und S 17 pldA in 2 Std. nicht nachweisbar abgebaut. Bei den Wildtypstämmen JE 5502 und S 15 liegt der Gehalt an PEA gemessen in Proz. von PEA-Radioaktivität zur Zeit t = 0 aus diesen Stämmen nach zweistündiger Inkubation um 1,9 bis 2,0 Proz. niedriger als zur Zeit t = 0.
- Phosphatidylglycerin (PG) wird bei allen Stämmen abgebaut, wobei sich eine Phase mit hoher Abbaurate in den ersten 20 Inkubationsminuten und daran anschließend eine Phase langsamen PG-Abbaus bei Wildtypstämmen unterscheiden lassen. Bei JE 5511 lpm und S 17 pldA kommt der Abbau von PG nach 20 bis 40 Min. zum Stillstand. Insgesamt werden bei JE 5502 47 Proz., JE 5511 47 Proz., S 15 37 Proz. und S 17 25 Proz. PG gemessen in Proz. von PG-Radioaktivität zur Zeit t = 0 abgebaut. Der PG-Gehalt aller untersuchten Stämme fällt dabei auf etwa 4,5 Proz. des Gesamtlipidgehalts.
- Fettsäuren werden ebenfalls bei allen Stämmen parallel zum Abbau von PG in den ersten 20 bis 40 Inkubationsminuten freigesetzt. Danach erfolgt eine weitere langsame Abspaltung von Fettsäuren nur noch bei den Wildtypstämmen JE 5502 und S 15. Insgesamt nimmt die Menge an freien Fettsäuren in Suspensionen von Sphäroplasten nach 2 Std. Inkubation bei 37° C beim Stamm JE 5502 um 81 Proz. zu, bei JE 5511 um 48 Proz., bei S 15 um 33 Proz. und bei S 17 um 9 Proz. gemessen in Proz. von Fettsäureradioaktivität zum Zeitpunkt t = 0, was auf Proz. von Gesamtlipid bezogen bei JE 5502 5,7 Proz., bei JE 5511 2,4 Proz., bei S 15 3,3 Proz. und bei S 17 1,3 Proz. Zunahme von freien Fettsäuren entspricht.

Der zweiphasige Verlauf der Kurven von PG-Abbau und Fettsäure-Freisetzung bei WT- und pldA- bzw. lpm-Mutantenstämmen zeigt, daß bei Sphäroplastenbildung und Inkubation von Sphäroplasten in Sucrosemedium zwei enzymatische Reaktionen ablaufen:

In einer schnell ablaufenden Reaktion wird spezifisch PG abgebaut. Dabei entstehen freie Fettsäuren; Cardiolipin war in den Extrakten nicht nachzuweisen. Interessant in dieser Hinsicht ist die Beobachtung von HENNING et al., daß stäbchenförmig mit EDTA und Lysozym ohne osmotischen Schock isolierte äußere Membran (membrane ghosts) von E. coli nur Phosphatidyläthanolamin und sehr wenig Phosphatidylglycerin und Cardiolipin enthält (43). E. coli-Zellen müssen deshalb eine für PG spezifische Lipase (in der äußeren Membran) enthalten, die durch EDTA/Lysozymbehandlung und Inkubation der Sphäroplasten bei 37° C induziert wird. Die Beobachtung, daß der Abbau von PG zum Stillstand kommt, wenn etwa 4,5 Proz. PG (vom Gesamtlipid) erreicht sind, gibt einen Hinweis darauf, daß nur PG in der äußeren Membran abgebaut wird. Diese PG-Lipase kann nicht mit Phospholipase A_1 aus der äußeren Membran identisch sein, da es auch in der Mutante S 17 pldA zum Abbau von Phosphatidylglycerin und zur Freisetzung von Fettsäuren kommt.

Erst nach 20 bis 40 Min. Inkubationszeit werden Unterschiede zwischen Wildtyp- und pldA- bzw. lpm-Mutante deutlich. Nach dieser Zeit kommt es bei beiden Mutanten zu keinem weiteren Abbau von PG und somit auch nicht zur weiteren Zunahme von Fettsäuren in den Sphäroplastensuspensionen. Nur bei Wildtypstämmen kann langsamer PG-Abbau und parallel dazu die Zunahme von freien Fettsäuren beobachtet werden. Auch PEA unterliegt in Suspensionen von Wildtyp-Sphäroplasten einem langsamen Abbau, der während der gesamten Inkubationszeit mit relativ langsamer Geschwindigkeit stattfindet. pldA- und lpm-Mutante bauen kein Phosphatidyläthanolamin ab. Bei dem Enzym, das den langsamen Abbau von PG und PEA bewirkt, muß es sich deshalb um Phospholipase A_1 handeln.

Ähnlich wie auch beim EDTA/Actinomycintest verhält sich die lpm-Mutante JE 5511 phänotypisch wie die Mutante S 17, in deren Zellhülle keine Phospholipase-Aktivität nachweisbar ist.

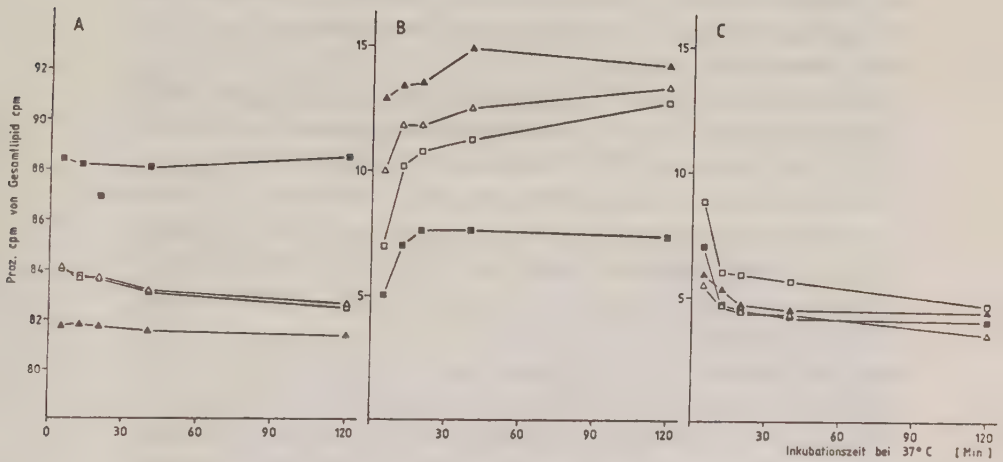


Abbildung 24: Abbau von Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylglycerol und Freisetzung von Fettsäuren bei Inkubation von Sphäroplasten bei 37° C.
Der Abbau von PEA (A) und PG (C) und die Freisetzung von FS (B) von Sphäroplasten der Stämme JE 5502 (-□-), S 15 (-Δ-), JE 5511 lpm (-■-) und S 17 pldA (-▲-) wurde bestimmt durch Extraktion von Aliquots der Sphäroplastensuspensionen (31) und Trennung der extrahierten Lipide auf Dünnschichtplatten mit Laufmittel II. Die prozentualen Anteile der einzelnen Komponenten von der Gesamtradioaktivität der einzelnen Proben wurde gegen die Zeit aufgetragen, zu der die Proben entnommen wurden. Als Zeit t = 0 ist die Zeit der Zugabe von EDTA und Lysozym definiert. Proben konnten erst nach gutem Durchmischen der Suspensionen entnommen werden.
t = 0 Werte für JE 5502 und JE 5511 vgl. Tabelle 3; S 15 und S 17 (29).

3.9.3.3. Zusammenfassung

Mit dem optischen EDTA/Lysozymtest wird die Geschwindigkeit der Lyse von Sphäroplasten photometrisch verfolgt.
Der lpm-Mutantenstamm JE 5504 scheidet während des Wachstums ca. 70 Proz. weniger Chloroform/Methanol-extrahierbare Lipide ins Medium aus als der Wildtypstamm JE 5501.
Bei Sphäroplastenbildung und anschließender Inkubation der Sphäroplasten bei 37° C laufen zwei verschiedene enzymatische Reaktionen ab:

- Ein schneller spezifischer Abbau von PG, der durch Abnahme des Gehaltes an PG und Zunahme von freien Fettsäuren in einer Sphäroplastensuspension verfolgt werden kann. Das Enzym, das diesen Abbau bewirkt, muß eine für PG spezifische Lipase sein, die PG der äußeren Membran abbaut.
- Ein relativ langsamer Abbau von PG und PEA durch Phospholipase A_1, der während der gesamten Inkubationszeit zu beobachten ist.

Die lpm-Mutante JE 5511 verhält sich in diesem Versuch wie die pldA-Mutante S 17. Nach dem schnellen Abbau von PG, der auch in diesen Stämmen zu beobachten ist, kommt es zu keinem weiteren Abbau von Phospholipiden durch Phospholipase A_1.

3.9.4. Bestimmung von Phospholipase A_1-Aktivität in Membranen von Wildtypzellen und lpm-Mutante

Untersuchungen an ganzen Zellen, die mit EDTA und Actinomycin (3.8.3.1.) und mit EDTA und Lysozym (3.9.3.2.) durchgeführt wurden, hatten gezeigt, daß lpm-Zellen mit modifiziertem Lipoprotein dasselbe Verhalten zeigen wie Zellen ohne Phospholipaseaktivität. Mit einem *in vitro* Enzymtest sollte deshalb untersucht werden, ob in Membranen vom lpm-Zellen Phospholipaseaktivität vorhanden ist. Untersucht wurden die Stämme JE 5501 und JE 5504 lpm und als Kontrolle S 15 und S 17 pldA. Membranen aus diesen Stämmen wurden isoliert und zum Enzymtest eingesetzt wie in Material und Methoden unter 2.2.19. beschrieben.

Tabelle 15: Radioaktivitätsverteilung in Lipiden nach Phospholipase A_1-Bestimmung

Lipid	JE 5501	JE 5504 lpm	S 15	S 17 pldA
Phosphatidyläthanolamin	48,2 %	70,8 %	34,6 %	91,9 %
Lysophosphatidyläthanolamin	47,2 %	28,3 %	50,5 %	7,8 %
Fettsäuren	4,6 %	0,9 %	14,8 %	0,3 %

100 000 g-Sediment von mit Ultraschall aufgebrochenen Zellen wurde als Enzymlösung mit ^{14}C-Phosphatidyläthanolamin bei Anwesenheit von NaDS, $CaCl_2$ und Methanol inkubiert. Das Reaktiongemisch wurde extrahiert, auf Dünnschichtplatten mit Laufmittel I getrennt und die Radioaktivität der einzelnen Komponenten bestimmt. Die Prozentzahlen geben Proz. der Radioaktivität einer Einzelkomponente von der Gesamtradioaktivität in einer Probe an.

Aus Tabelle 15 ist ersichtlich, daß außer beim Stamm S 17 pldA bei allen Stämmen gut meßbare Phospholipase-Aktivität vorhanden ist, die als Abbau von Phosphatidyläthanolamin bzw. als Auftreten von Lysophosphatidyläthanolamin bestimmt werden kann. Die Aktivität von Phospholipase im Stamm JE 5504 lpm ist im Vergleich zur Lipaseaktivität von JE 5501 und S 15 um etwa die Hälfte reduziert.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit den genetischen Untersuchungen in 3.8.3.1., bei denen sich gezeigt hatte, daß der Genort, der für die *in vivo* Phospholipase (In)aktivität codiert, nicht mit dem Ort für das Phospholipase-Strukturgen (1) identisch ist.

JE 5504 lpm besitzt also eine im *in vitro*-Test funktionsfähige Phospholipase A_1, die im Test jedoch geringere Aktivität als das Wildtyp-Enzym aufweist.

Bei Beobachtungen an ganzen Zellen (bzw. Sphäroplasten) ist Phospholipase aus JE 5504 lpm im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym nicht aktivierbar.

4. DISKUSSION

Als diese Untersuchungen am Lipoprotein aus der Mutante JE 5511 begonnen wurden, nahm man nach (106) an, daß die Dimerenbildung des Mutantenlipoproteins auf das Fehlen des als Thioäther an Cystein gebundenen Diglycerids zurückzuführen ist. Bei genauerer Charakterisierung von Murein-Lipoprotein aus dieser Mutante konnte jedoch gezeigt werden, daß es sich in folgenden Eigenschaften vom Wildtyplipoprotein unterscheidet:

- Die Dimerenbildung wird durch einen Aminosäureaustausch Arg - Cys ermöglicht, dessen Ort am C-terminalen Ende der Polypeptidkette nahe der Bindungsstelle am Murein bestimmt werden konnte.
- Lipoprotein aus JE 5511 enthält Glycerylcystein, allerdings solches mit unvollständig acyliertem Glycerinteil.

Bei Fettsäurebestimmungen von Lipoprotein mit defektem Lipidteil, das aus 12 verschiedenen Stämmen isoliert wurde, wurde deutlich, daß im Durchschnitt 1,5 Fettsäuren am Mutantenlipoprotein gebunden sind, wobei die Extremwerte bei gaschromatographischen Bestimmungen zwischen 0,7 und 2,3 liegen. Es konnte gezeigt werden, daß diese Streuung nur zu geringem Teil methodisch bedingt ist; sie spiegelt vielmehr Einflüsse durch Medium und Aufzucht wieder, die noch nicht genau charakterisiert werden konnten. Die im Vergleich zu Lipoprotein aus Wildtypzellen relativ hohe Streuung der Zahl der glyceringebundenen Fettsäuren von Mutantenlipoprotein kann dahin interpretiert werden, daß der genetische Block in der Acylierung von Glycerylcystein bei verschiedenen Mutantenstämmen unterschiedlich stark ausgeprägt ist und/oder einer stärkeren Beeinflussung durch Umweltbedingungen unterliegt.

INOUYE et al. charakterisierten freies Lipoprotein aus einer lpp-Mutante von HIROTA: dem Stamm K 63-1 (54). Dieser muß identisch sein mit JE 5538 von den Stämmen, die im Stammbaum in Abbildung 16 aufgeführt sind. Da K 63-1 aus einer P1-Transduktion hervorging, bei der K 63 als Rezi-

pient den lpp-Genbereich von JE 5500 erhielt, muß es sich bei K 63-1 um einen Stamm handeln, der Lipoprotein mit intaktem Lipidteil enthält. Trotzdem von INOUYE nur zwei Mol Fettsäuren pro Mol Lipopeptid bestimmt wurden, muß Lipopeptid aus diesem Stamm dem Lipopeptid aus Wildtypzellen weit ähnlicher sein als dem Lipopeptid aus lpm-Zellen, da es im Gegensatz zum Lipopeptid aus JE 5511 mit Säure präzipitierbar ist.

Die Ergebnisse der Untersuchungen, die mit dem lpp-Stamm JE 5525 und dem dazu isogenen merodiploiden Stamm JE 5549 - der ein Plasmid mit Gen für intaktes Lipoprotein enthält - zeigten nicht nur, daß JE 5511 eine Doppelmutante mit mutiertem Peptidteil (lpp) und mutiertem Lipidteil (lpm) des Lipoproteins darstellt, sondern ließen auch Schlüsse auf die Biosynthese des Lipidteils von E. coli-Lipoprotein zu: Da im Durchschnitt aller lpm-Lipoproteinmoleküle nur 0,5 Fettsäuren mit Glycerin verestert sind, lpm-Lipoprotein aber die gleiche Menge an Glycerylcystein enthält wie WT-Protein, muß an vielen Lipoprotein-Molekülen Glycerin ohne Fettsäuren gebunden sein. Für den Biosyntheseweg des Lipidteils von Lipoprotein bedeutet dies, daß nicht, wie früher vorgeschlagen wurde (39), ein komplettes CDP-Diglycerid an das Aminoende des Proteins gebunden wird, sondern, daß die freien OH-Gruppen von Glycerin erst dann mit Fettsäuren verestert werden, wenn dieses an das Peptid gebunden ist. Eine gute Bestätigung fand diese Hypothese (93) durch Ergebnisse, die von SCHULMAN und KENNEDY (100) und von CHATTOPADHYAY und WU (25) veröffentlicht wurden. SCHULMAN und KENNEDY konnten nachweisen, daß der Glycerinteil des Lipoprotein-Lipids von einem Molekül abgeleitet ist, das in der Zelle in relativ hoher Zahl vorkommt und - trotz relativ hohen Umsatzes - eine lange Halbwertszeit haben muß.

Damit war CDP-Diglycerid als Glycerin-Donor für Lipoprotein ausgeschlossen. Die Autoren sahen in Cardiolipin oder Phosphatidylglycerin geeignete Donoren für ein komplettes Diglycerid. Eigene Untersuchungen, die zusammen mit G. PLUSCHKE an Lipoprotein aus Cardiolipin-Synthetase-Mutanten (cls) (81) durchgeführt wurden, zeigten, daß im Fettsäure-

gehalt von Lipoprotein aus solchen Mutanten kein signifikanter Unterschied zu Wildtyp-Lipoprotein besteht. Somit konnte auch Cardiolipin als Vorläufer für den Lipidteil von Lipoprotein ausgeschlossen werden. Während der Untersuchungen an den cls-Mutanten erschien eine Publikation von CHATTOPADHYAY und WU (25), in der nachgewiesen wurde, daß der Glycerinteil des Lipoproteins vom nicht acylierten Glycerin des Phosphatidylglycerins stammt. In einer bisher nicht näher charakterisierten Reaktion wird der C-1 Kohlenstoff des sn-Glycerins an die freie SH-Gruppe des Cysteins im Lipoprotein gebunden. Ein weiteres Modifikationsenzym - die Lipoprotein-Acylase - ist notwendig, um Fettsäuren mit dem am Lipoprotein gebundenen Glycerin zu verestern. Alle weiteren Untersuchungen galten der Charakterisierung dieser Acylaseaktivität. Es konnten Stämme gewonnen werden, die nur die Peptidmutation oder nur die Lipidmutation von Lipoprotein im Genom tragen. Nach der Kreuzung des lpm-Stammes JE 5504 mit einem Wildtypstamm wurden Rekombinanten isoliert. Fettsäurebestimmungen von Lipoprotein aus diesen Rekombinanten zeigten, daß ein zur Acylierung von Lipoprotein essentielles Gen, das bei lpm-Mutanten mutiert ist, zwischen den Merkmalen his und argG auf dem Chromosom liegt. In diesem Genbereich kartieren auch die bei allen lpm-Stämmen beobachtete partielle Globomycinresistenz und die Resistenz gegen EDTA plus Actinomycin.
Bei Einwirken von Globomycin auf E. coli-Zellen kommt es zu einer Anhäufung von Prolipoprotein in diesen Zellen (57). MIZUSHIMA konnte zeigen (46), daß am Prolipoprotein von Globomycin-behandelten Zellen Glycerin und Fettsäuren gebunden sind. Da Prolipoprotein mit gebundenem Diglycerid als stark amphiphiles Molekül eine lytische Wirkung auf Zellen ausüben kann, könnte die Anreicherung von Prolipoprotein zum Zelltod führen. lpm-Lipoprotein mit unvollständigem Diglycerid weist keine solche Detergenswirkung auf, die Zellen werden partiell resistent gegen Globomycin. INUKAI et al. sehen in Globomycin einen Hemmstoff für die hydrolytische Abspaltung des Propeptids von Prolipoprotein (57). Allerdings sind auch Zellen, die kein Lipoprotein be-

sitzen, Globomycin-sensitiv - nur muß dieses in hundertfach höherer Konzentration zur Kultur zugesetzt werden (57). Diese Beobachtung und das Auftreten von Resistenzen, die primär nicht durch Lipoproteinmodifikationen zu erklären sind (46), machen deutlich, daß der Wirkort von Globomycin nicht (allein?) beim Lipoprotein-Modifikationsenzym liegen kann. Die Hemmung der Abspaltung des Propeptids vom Lipoproteinmolekül ist eine Folge der Globomycineinwirkung auf einen bisher unbekannten Ort in der Zelle, wobei das Fehlen von Fettsäuren am Prolipoprotein durchaus partielle Resistenz der lpm-Zellen gegen Globomycin zur Folge haben kann.

Zellen mit modifiziertem Lipoprotein verhalten sich in folgenden Eigenschaften wie eine Mutante, in deren äußerer Membran keine Phospholipase A_1-Aktivität nachweisbar ist (1):

- lpm-Zellen sind Globomycin-resistent;
- lpm-Zellen sind resistent gegen eine Behandlung mit EDTA plus Actinomycin;
- in Sphäroplasten aus lpm-Zellen kommt der Abbau von Phospholipiden nach etwa 20 Min. Inkubation bei 37° C zum Stillstand.

Als Genort für die Resistenz gegen EDTA plus Actinomycin konnte wie für Globomycin-Resistenz und das Auftreten des lpm-Phänotyps die his - argG-Region im Chromosom festgelegt werden. Aufgrund der Korrelationen von Globomycin-Resistenz und lpm-Phänotyp, lpm-Phänotyp und reduzierter *in vivo*-Aktivität von Phospholipase A_1, sowie von defektem Strukturgen für Phospholipase A_1 in Nojimas Mutante S 17 und Globomycin-Resistenz kann man auf einen engen Zusammenhang der drei Merkmale Phospholipase-Aktivität, Globomycin-Resistenz und defektem Lipidteil von Lipoprotein schließen.

Die physiologische Rolle von Phospholipase A_1 in der E. coli-Zelle ist bis jetzt noch weitgehend ungeklärt. Untersuchungen mit Phospholipase-Mutanten zeigten, daß Phospholipase Fettsäuren freisetzt, mit denen der nicht acylierte Glycerinteil von Phosphatidylglycerin verestert werden kann (74). Eine zusätzliche, als hitzelabiler Faktor be-

zeichnete Komponente soll bei der Synthese von Acyl-Phosphatidylglycerin mitwirken. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß im Überstand von Zellhomogenaten ein Faktor enthalten ist, der die Hydrolyse von Phosphatidyläthanolamin bei Abwesenheit von Detergens im *in vitro*-Enzymtest hemmt (73). Dies sind Hinweise darauf, daß die Aktivität von Phospholipase in der Zelle einer Regulation unterliegt, deren genauer Mechanismus bis jetzt noch nicht näher charakterisiert werden konnte.

Da genetische Untersuchungen von Rekombinanten deutlich machten, daß der Genort für die bei lpm-Zellen beobachtete EDTA/Actinomycinresistenz durch die reduzierte *in vivo*-Aktivität von Phospholipase A_1 angezeigt wird, nicht mit dem Strukturgen von Phospholipase A_1 identisch ist, kann angenommen werden, daß lpm-Mutanten in der Regulation von Phospholipase-Aktivität mutiert sind.

Ein weiterer Fall, bei dem sich - wie in dieser Arbeit - *in vivo* und *in vitro* gemessene Aktivität von Phospholipase A_1 unterscheidet, ist für envC-Mutanten beschrieben (65): In diesem Fall wird bei Mutanten eine stark erhöhte *in vivo*-Aktivität von Phospholipase A_1 beobachtet; der *in vitro*-Test ergab bei homogenisierten Wildtyp- und Mutantenzellen gleiche Aktivität.

Wie aus dem Verhalten der Rekombinante aa 19 deutlich wird, kann reduzierte Phospholipase A_1-Aktivität alleine nicht zu einer Reduzierung der Fettsäurezahl des Lipoprotein-Diglycerids führen. Nur Rekombinanten, die EDTA/Actinomycin-resistent sind und die darüber hinaus den purE-Genbereich von JE 5504 enthalten, zeigen den lpm-Phänotyp. Auf dem purE-Genbereich von JE 5504, der den Hfr-Origin einschließen könnte, liegen die Gene, die erhöhten Einbau von ^{14}C-Acetat aus dem Medium in Zellipide und die EDTA/Lysozym-Resistenz verursachen. Beide Eigenschaften sind unabhängig voneinander, da alleine EDTA/Lysozym-Resistenz durch Kurieren von HfrC-Stämmen verlorengehen kann.

Der erhöhte Einbau von ^{14}C-Acetat in Lipide und die daraus resultierende doppelt so hohe spezifische Markierung von Fettsäuren in lpm-Zellen kann nur über einen reduzierten

intrazellulären Pool von Acetat oder AcetylCoA erklärt werden. NUNN et al. stellten fest (75), daß die Gesamtmenge an Radioaktivität, die in Glycerin-3-phosphat-auxotrophe plsB-Zellen unter Glycerinphosphat-Mangelbedingungen in das Gesamtlipid eingebaut wird, gleich hoch ist wie in Zellen, die in Medium mit Glycerinphosphat gezüchtet wurden. Unter Glycerinphosphat-Mangelbedingungen werden jedoch nur 10 Proz. der normalen Menge von Fettsäuren synthetisiert. Daraus schließen die Autoren, daß diese Umstände zu einer höheren spezifischen Markierung der Fettsäuren mit ^{14}C-Acetat führen, was die Folge eines über die nahezu zum Stillstand gekommene Phospholipidsynthese regulierten, stark erniedrigten Pools von Acetat oder Acetyl-CoA in den Zellen ist. Die erhöhte spezifische Markierung von Fettsäuren in lpm-Zellen kann demnach auf reduzierte Phospholipidsynthese zurückzuführen sein. Die bei lpm-Zellen um 70 Proz. reduzierte Ausscheidung von Phospholipiden ins Medium könnte ebenfalls darauf zurückgeführt werden.
CRONAN und Mitarbeiter (27) isolierten eine plsA-Mutante, die wie die plsB-Mutante eine mutierte Glycerophosphat-Acyltransferase aufweisen soll. SNIDER und KENNEDY konnten durch Anreichung des Enzyms aus beiden Mutanten nachweisen (102), daß plsA-Mutanten keinen Defekt im Strukturgen von Glycerophosphat-Acyltransferase aufweisen, sondern Regulationsmutanten sein müssen (84), bei denen nicht nur die Phospholipidsynthese reduziert ist. Der Genort der plsA-Mutation liegt bei 11 Min. auf dem E. coli-Chromosom nahe dem purE-Merkmal bei 12 Min., in dessen Nähe sich auch das mutierte Gen befinden muß, das den erhöhten Einbau von ^{14}C-Acetat in Lipide aus lpm-Zellen verursacht.
Eine weitere Eigenschaft, die bei allen bisher zur Verfügung stehenden lpm-Stämmen beobachtet werden konnte, stellt die erhöhte Stabilität von Sphäroplasten aus diesen Stämmen gegen Lyse in osmotisch geschütztem Medium dar. Aus genetischen (3.8.3.6.) und biochemischen (3.9.3.2.) Daten wird offensichtlich, daß dies nicht durch die reduzierte *in vivo*-Aktivität der Phospholipase A_1 in lpm-Zellen erklärt werden kann. Der optische Test, mit dem die Einwirkung von EDTA

und Lysozym auf E. coli-Zellen beobachtet wurde, ist ähnlich schon 1967 von BIRDSELL und COTA-ROBLES (8) beschrieben worden. Auch WITHOLT (114) beobachtete die Lyse von Sphäroplasten optisch. In beiden Fällen wurden Kurven erhalten, die denen entsprachen, die in dieser Arbeit bei Sphäroplasten aus Wildtypzellen gemessen wurden.
Der in 3.9.3.1. beschriebene Zentrifugationsversuch ergab, daß mit diesem optischen Test die Geschwindigkeit der Lyse von Sphäroplasten und nicht die Geschwindigkeit der Bildung von Sphäroplasten gemessen wird. Da die Stabilität von Sphäroplasten aus Wildtypzellen durch Spermidinzugabe in der Weise erhöht werden kann, daß die Abnahme der optischen Dichte ähnlich langsam erfolgt wie bei lpm-Zellen, muß angenommen werden, daß Zellen, die im optischen Test Mutantenverhalten zeigen, den Verlust von zweiwertigen Metallionen durch nicht mit EDTA komplexierbare Komponenten kompensieren können. So könnte ein höherer Gehalt von basischen Polyaminen in den Zellen, die den purE-Bereich von JE 5504 enthalten, deren erhöhte EDTA/Lysozymresistenz bewirken.
Im Gegensatz zum EDTA/Lysozymtest, mit dem die Lyse von Sphäroplasten verfolgt werden kann, wird mit dem EDTA/Actinomycintest nur die Wirkung von EDTA auf die äußere Membran intakter Bakterienzellen erfaßt. Durch Verschiebung des Ionengleichgewichts und der daraus resultierenden Freisetzung von Lipopolysacchariden ins Medium wird die Phospholipase A_1 der äußeren Membran aktiviert. Die bei der Rekombinante gs 11 beobachtete schwache Ausprägung des pldA-Phänotyps (vgl. 3.8.3.2.) kann nicht durch dieselbe Mutation im Genabschnitt argG - his bedingt sein wie bei den anderen untersuchten pldA-Phänotypen, da diese immer ein eindeutiges Verhalten im EDTA/Actinomycintest zeigen. Auch die EDTA/Lysozym-sensitive Rekombinante aa 19 zeigt eine deutliche Ausprägung des pldA-Phänotyps. Das Vorhandensein des purE-Genbereichs von JE 5504 ist demnach nicht notwendig zur Ausprägung des pldA-Phänotyps, kann aber durchaus - wie im Falle von gs 11 - wegen geringerer EDTA-Sensitivität, bedingt durch einen erhöhten Gehalt dieser Zellen an

nicht zu komplexierenden zweiwertigen Ionen, den Durchtritt von Actinomycin durch die äußere Membran erschweren.
Da Zellen des HfrC-Stammes W 72-6 im optischen Test dasselbe Verhalten zeigen wie Zellen von W 2252 und anderen, von diesem abgeleiteten HfrC-Stämmen, ist die erhöhte Stabilität von Sphäroplasten aus diesen Stämmen mit hoher Wahrscheinlichkeit an die Anwesenheit des HfrC-Partikels im Chromosom gekoppelt. Werden HfrC-Zellen kuriert, so geht bei einem Teil der Zellen auch die erhöhte Stabilität der Sphäroplasten verloren. F^--Rekombinanten, die den purE-Genbereich von JE 5504 tragen, zeigen ebenfalls EDTA/Lysozymresistenz. Beide Subpopulationen von W 2252 - von denen eine Q_β-resistent ist und somit den Hfr-Charakter verloren hat - sind EDTA/Lysozym-resistent. In Kulturen von W 2252 treten immer beide Subpopulationen nebeneinander auf, obwohl sich dort Hfr-Zellen wegen der hohen Übertragungsrate des Hfr-Partikels stark anreichern müßten: Aus einer Übernachtkultur von W 2252 konnten von 80 untersuchten Kolonien nur 6 HfrC-Kolonien isoliert werden.
Diese Beobachtungen geben Anlaß, folgende Arbeitshypothese aufzustellen, die, unabhängig von ihrem möglichen Zusammenhang mit den Auftreten des lpm-Phänotyps, mit weiteren Experimenten überprüft werden soll: Auf dem Hfr-Origin liegt ein Gen, durch das das von außen anregbare autolytische System der weiblichen Zelle sofort nach dem Eindringen des Hfr-Origins in die F^--Zelle abgeschaltet wird. Damit wird die Interaktion dieser Zellen mit anderen Hfr-Zellen unterbunden und das Eindringen von weiterer DNS verhindert. Es ist bekannt, daß weibliche Zellen untereinander, weibliche Zellen mit Hfr-Zellen, nie aber Hfr-Zellen untereinander NaDS-stabile Konjugationsaggregate bilden können (2). Zellen, bei denen das Hfr-Plasmid unvollständig aus dem Chromosom ausgeschnitten wurde (Q_β-resistente Subpopulation von W 2252) oder Zellen, die nur den Hfr-Origin enthalten, verhalten sich - die Autolyse betreffend - weiterhin wie Hfr-Zellen und können keine Zellkontakte zu anderen Hfr-Zellen ausbilden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß die zwei, bei allen lpm-Stämmen beobachteten, auf dem purE-Bereich von JE 5504 codierten Eigenschaften - erhöhte spezifische Acetatmarkierung der Lipide und erhöhte EDTA/Lysozymresistenz - alleine nicht hinreichend sind, um den lpm-Phänotyp hervorzurufen. Mit Stämmen, die den purE-Genbereich von JE 5504 nicht enthalten und die andererseits den vollständigen his - argG-Genbereich aus diesem Stamm aufweisen, soll überprüft werden, welche dieser Eigenschaften zusammen mit der auf dem his - argG-Genbereich codierten reduzierten Phsopholipaseaktivität *in vivo* zur Ausprägung des lpm-Phänotyps notwendig ist. Ein hypothetisches Modell soll dies verdeutlichen und als Arbeitshypothese für weitere Untersuchungen zur Biosynthese des Lipidteils von E. coli-Lipoprotein dienen.

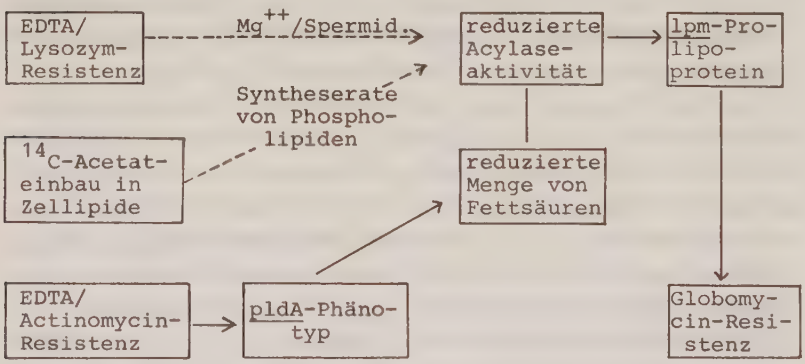


Abbildung 24: Hypothetisches Modell der Acylierung von Glycerylcystein im Prolipoprotein von lpm-Zellen. Mit diesem Modell soll deutlich gemacht werden, daß es sich bei lpm-Zellen nicht um Lipoprotein-Acylase-Mutanten handelt, sondern daß die reduzierte Aktivität dieser Acylase auf pleiotrophe Effekte anderer Mutationen in diesen Stämmen zurückzuführen ist.

Sobald die oben erwähnten Stämme, die nur den his - argG-Genbereich von JE 5504 enthalten, zur Verfügung stehen, soll auch untersucht werden, welche der folgenden, bei lpm-Stämmen beobachteten Eigenschaften Folgen des reduzierten Fettsäuregehaltes von Lipoprotein sind:

- Der erhöhte Lipidgehalt der äußeren Membran (3.9.1.1.), durch den eventuell der unvollständige Lipidteil des Lipoproteins kompensiert wird.
- Das unterschiedliche Bandenmuster der Cytoplasmamembran.
- Die reduzierte Ausscheidung von Phospholipiden in das Kulturmedium.

Weiterhin ist geplant, den schnellen spezifischen Abbau von Phosphatidylglycerin während der Sphäroplastenbildung näher zu untersuchen. HENNING et al. (43) fanden kein Phosphatidylglycerin in "membrane ghosts", OSBORN (77) fand nach Membrantrennung, die eine Sphäroplastenbildung einschließt, einen im Vergleich zur Cytoplasmamembran um 50 bzw. 75 Proz. reduzierten Gehalt der äußeren Membran an Phosphatidyläthanolamin bzw. Cardiolipin. Da Phosphatidylglycerin als Glycerindonor für den Lipidteil von Glycerylcystein dient, könnte einer solchen, Phosphatidylglycerin-spezifischen Lipase eine Funktion bei der Acylierung des Glycerinteils des Lipoproteinlipids zukommen.

Konformationsuntersuchungen an freiem Lipoprotein aus der lpp/lpm-Doppelmutante JE 5511 hatten ergeben, daß sich dieses, von seiner wahrscheinlich durch die Isolierung bedingten unterschiedlichen Anfangskonformation abgesehen, grundsätzlich gleich verhält wie freies Lipoprotein aus Wildtypzellen. Nur in Natriumdesoxycholat-Lösungen über der kritischen micellaren Konzentration (cmc) erreicht das Mutantenlipoprotein nicht den hohen (75 Proz.) α-Helixgehalt wie Wildtyplipoprotein. Die Wechselwirkung von Lipoprotein mit NaDS, die bei Erreichen der cmc des Detergens durch Konformationsänderung (die bei allen untersuchten Lipoproteinproben zu etwa 50 Proz. α-Helix führt) beobachtet werden kann, ist ein Hinweis darauf, daß etwa 50 Proz. des Lipoproteinmoleküls in die hydrophoben Detergensmicellen inte-

griert sind. Dabei wird die α-helicale Konformation dieses Teils der Polypeptidkette durch hydrophobe Wechselwirkungen der NaDS-Micellen mit den hydrophoben Bereichen im Proteinmolekül und durch Protein-Protein-Wechselwirkungen (Aggregation des Lipoproteins in Detergenslösungen) stabilisiert. Ein Teil des Proteins wird nicht in die Micellen integriert und wahrscheinlich durch NaDS-Monomere in partiell denaturiertem Zustand gehalten. Das Verhalten von Wildtyp-Lipoprotein in desoxycholathaltigen Lösungen gibt Hinweise darauf, daß bei Abwesenheit von denaturierenden Detergenzien auch im nicht in Micellen integrierten Teil des Moleküls zusätzliche α-helicale Bereiche gebildet werden können. Wird Mutantenlipoprotein in Desoxycholatlösungen untersucht, so kann kein weiterer Anstieg des α-helicalen Gehalts von 50 Proz. gemessen werden. Dies zeigt, daß die Fettsäurezahl und der Aminosäureaustausch von Lipoprotein aus JE 5511 keinen Einfluß auf den Teil des Proteins haben, der in die Micellen integriert wird. Vielmehr scheinen die Fettsäuren über hydrophobe Wechselwirkungen die Konformation des nicht in die Micellen integrierten Teils des Proteins zu beeinflussen. Bei hoher NaDS-Monomerkonzentration werden die Bindungen zwischen den Fettsäuren und dem Proteinteil gelöst - es kommt zur Denaturierung des nicht micellengebundenen, α-helicalen Teils des Proteins. Fehlen die glycerolgebundenen Fettsäuren, so können im nicht micellengebundenen Teil des Mutantenproteins keine α-helicalen Bereiche entstehen.
Um diese Wechselwirkung der Fettsäuren mit dem nicht in Micellen integrierten Teil des Lipoproteins zu bestätigen, müssen diese Versuche mit Lipoprotein aus lpm-Zellen wiederholt werden, da beim Lipoprotein aus der Doppelmutante Einflüsse der Peptidmutation nicht ausgeschlossen werden können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Lipoprotein aus der Mutante JE 5511 von Y. HIROTA wurde isoliert und charakterisiert:

- Ein Aminosäureaustausch Arg → Cys, dessen Ort am C-terminalen Ende der Polypeptidkette nahe der Bindungsstelle am Murein bestimmt werden konnte, führt zu der ursprünglich beobachteten Dimerenbildung des Mutanten-Lipoproteins.
- Lipoprotein aus dieser Mutante enthält einen unvollständigen Lipidteil. Durchschnittlich fehlen 1,5 der 2 mit Glycerylcystein veresterten Fettsäuren.
- Die Konformation von Mutanten- und Wildtyp-Lipoprotein ist in Lösungen von NaDS gleich, lediglich in Lösungen, die das Detergens Natriumdesoxycholat über der kritischen micellaren Konzentration enthalten, weist Mutanten-Lipoprotein einen im Vergleich zu Wildtyp-Lipoprotein reduzierten Gehalt an α-Helix auf.

Die Eigenschaften des Lipoproteins aus dieser Mutante sind auf eine Mehrfachmutation im Peptidgen (lpp) und in Genen, die für die Acylierung des Lipidteils von Lipoprotein (lpm) essentiell sind, zurückzuführen.

Es konnten Stämme isoliert werden, die entweder nur lpp-Lipoprotein oder nur lpm-Lipoprotein enthalten. Untersuchungen, die mit Rekombinanten aus einer Kreuzung eines Wildtypstammes mit einem lpm-Mutantenstamm durchgeführt wurden, führten zu folgenden Ergebnissen:

- Alle Stämme, bei denen die gaschromatographische Bestimmung des Fettsäuregehalts von Lipoprotein reduzierte Werte ergab (lpm-Stämme), sind partiell Globomycin-resistent.
- Alle lpm-Stämme zeigen reduzierte Aktivität von Phospholipase A_1 *in vivo* (pldA-Phänotyp).
- Als Genort für das Auftreten des lpm-Phänotyps und dieser damit verbundenen Eigenschaften wurde der Bereich zwischen den Merkmalen his und argG auf dem Chromosom bestimmt.

- Das Auftreten von reduzierter *in vivo*-Aktivität von Phospholipase A_1 alleine ist nicht hinreichend zur Ausprägung des lpm-Phänotyps.
- Alle lpm-Rekombinanten enthalten den purE-Genbereich des zur Kreuzung eingesetzten lpm-Stammes. Auf diesem Bereich liegen Gene, die folgende Eigenschaften der lpm-Mutanten bewirken:
  a) Erhöhte Stabilität von Sphäroplasten gegen Lyse in osmotisch geschütztem Medium.
  b) Erhöhte spezifische Markierung von Fettsäuren mit im Medium angebotenem ^{14}C-Acetat.

  Beide Eigenschaften sind unabhängig voneinander.
- Das Vorhandensein des purE-Bereichs aus dem Chromosom des lpm-Stammes ist alleine nicht hinreichend zur Ausprägung des lpm-Phänotyps. Dieser kann nur beobachtet werden, wenn der untersuchte Rekombinantenstamm den purE- und den his - argG-Genabschnitt des lpm-Stammes enthält.

Aufgrund dieser Beobachtungen wird ein Modell der Acylierung des Lipoprotein-Diglycerids vorgeschlagen.
Dieses im einzelnen noch zu bestätigende Modell zeigt, daß in lpm-Zellen eine Lipoprotein-Acylase in ihrer Aktivität reduziert ist, was den unvollständigen Lipidteil von Lipoprotein zur Folge hat. Die reduzierte Aktivität dieses Enzyms wird bewirkt durch Membraneigenschaften, die auf dem purE-Genbereich codiert sind, zusammen mit reduzierter *in vivo*-Aktivität von Phospholipase A_1 und dem daraus resultierenden Mangel an zur Acylierung verfügbaren Fettsäuren.

6. LITERATURVERZEICHNIS

(1) ABE, M., OKAMOTO, N., DOI, O., NOJIMA, S. (1974) J. Bacteriol. 119: 543-546

(2) ACHTMAN, M., SKURRAY, R. (1977) in *Receptors and Recognition* (Reissig, J.L. ed.) Band 3, pp 233-280, Chapman & Hall London

(3) ADACHI, H., NAKANO, M., INUZAKA, M., TOMOEDA, M. (1973) J. Bacteriol. 109: 1114-1124

(4) ALPHEN, W. van, SELM, N. van, LUGTENBERG, B. (1978) Mol. Gen. Genet. 159: 75-83

(5) BACHMANN, B.J. (1972) Bact. Rev. 36: 525-557

(6) BADDILEY, J. (1972) Essays in Biochem. 8: 35-77

(7) BAYER, M., LEIVE, L. (1977) J. Bacteriol. 130: 1364-1381

(8) BIRDSELL, D.C., COTA-ROBLES, E.H. (1967) J. Bacteriol. 93: 427-437

(9) BOSCH, V. (1974) Dissertation, Freie Universität Berlin

(10) BRAUN, V. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415: 355-377

(11) BRAUN, V. (1978) Symposia of the Society for General Microbiology XXVIII: *Relations between Structure and Function in the Procaryotic Cell*

(12) BRAUN, V., BOSCH, V. (1972) Eur. J. Biochem. 28: 51-69

(13) BRAUN, V., BOSCH, V. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69: 970-974

(14) BRAUN, V., BOSCH, V., KLUMPP, E.R., NEFF, I., MAYER, H., SCHLECHT, S. (1976) Eur. J. Biochem. 62: 555-566

(15) BRAUN, V., HANCOCK, R.E.W., HANTKE, K., HARTMANN, A. (1976) J. supramolec. Struct. 5: 37-58

(16) BRAUN, V., HANTKE, K. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43: 89-121

(17) BRAUN, V., HANTKE, K. (1977) in: *Receptors and Recognition* (Reissig, J.L. ed.) Band 3, pp 99-138, Chapman & Hall London

(18) BRAUN, V., HANTKE, K., HENNING, U. (1975) FEBS Lett. 60: 26-28

(19) BRAUN, V., REHN, K. (1969) Eur. J. Biochem. 10: 426-438

(20) BRAUN, V., REHN, K., WOLFF, H. (1970) Biochemistry 9: 5041-5049

(21) BRAUN, V., ROTERING, H., OHMS, J.P., HAGENMAIER, H.P. (1976) Eur. J. Biochem. 70: 601-610

(22) BRAUN, V., SCHALLER, K., WABL, M.R. (1974) Antimic. Ag. Chemother. 5: 520-533

(23) BRAUN, V., WOLFF, H. (1970) Eur. J. Biochem. 14: 387-391

(24) BRAUN, V., WOLFF, H. (1975) J. Bacteriol. 123: 888-897

(25) CHATTOPADHYAY, P.K., WU, H.C. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5318-5322

(26) CHOU, P.Y., FASMAN, G.D. (1974) Biochemistry 13: 222-245

(27) CRONAN, J.E. Jr., RAY, T.K., VAGELOS, P.R. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 65: 737-744

(28) DATTA, P.B., ARDEN, B., HENNING, U. (1977) J. Bacteriol. 131: 821-829

(29) DOI, O., NOJIMA, S. (1973) J. Biochem. 74: 667-674

(30) FAIRBANKS, G., STECK, T.L., WALLACH, D.F.H. (1971) Biochemistry 10: 2606-2617

(31) FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, S. (1957) J. Biol. Chem. 226: 497-510

(32) FORMANEK, H., FORMANEK, S., WAWRA, H. (1974) Eur. J. Biochem. 46: 279-294

(33) FREER, J.H., SALTON, M.R.J. (1971) in *Microbial Toxins* (Weinbaum, G., Kadis, S., Ajl, S.J. eds.) Band 4, pp 67-126, Academic Press N.Y.

(34) GMEINER, J., KROLL, H., MARTIN, H.H. (1978) Eur. J. Biochem. 83: 227-233

(35) HALEGOUA, S., SEKIZAWA, J., INOUYE, M. (1977) J. Biol. Chem. 252: 2324-2330

(36) HANCOCK, R.E.W., BRAUN, V. (1976) FEBS Lett. 65: 208-210

(37) HANTKE, K. (1973) Dissertation, Universität Tübingen

(38) HANTKE, K. (1978) Mol. Gen. Genet. 164: 131-135

(39) HANTKE, K., BRAUN, V. (1973) Eur. J. Biochem. 34: 284-296

(40) HANTKE, K., BRAUN, V. (1975) FEBS Lett. 49: 301-305

(41) HARDAWAY, K.L., BULLER, C.S. (1979) J. Bacteriol. 137: 62-68

(42) HELENIUS, A., SIMON, K. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415: 29-79

(43) HENNING, U., HÖHN, B., SONNTAG, T. (1973) Eur. J. Biochem. 39: 27-36

(44) HINDENACH, I., HENNING, U. (1975) Eur. J. Biochem. 59: 207-213

(45) HIROTA, Y., SUZUKI, H., NISHIMURA, Y., YASUDA, S., NISHIMURA, A., YAMADA, M. (1978) Molec. gen. Genet. 167: 1-9

(46) HIROTA, Y. persönliche Mitteilung

(47) HIROTA, Y. unveröffentlichte Ergebnisse

(48) HIROTA, Y., SUZUKI, H., NISHIMURA, Y., YASUDA, S. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 1417-1420

(49) HIRS, G.H.W. (1967) Methods in Enzymol. Band XI (Hirs, C.H.W. ed.) pp 197-199

(50) HÖLTJE, J. persönliche Mitteilung

(51) INOUYE, M. (1971) J. Biol. Chem. 246: 4834-4838

(52) INOUYE, M. persönliche Mitteilung an V. Braun

(53) INOUYE, M., SHAW, J., SHEN, C. (1972) J. Biol. Chem. 247: 8154-8159

(54) INOUYE, S., LEE, N., INOUYE, M., WU, H.C., SUZUKI, H., NISHIMURA, Y., IKETANI, H., HIROTA, Y. (1977) J. Bacteriol. 132: 308-313

(55) INOUYE, S., TAKEISHI, K., LEE, N., DeMARTINI, M., HIRASHIMA, A., INOUYE, M. (1976) J. Bacteriol. 127: 555-563

(56) INUKAI, M., NAKAJIMA, M., OSAWA, M., HANEISHI, T., ARAI, M. (1978) J. Antibiotics 31: 421-425

(57) INUKAI, M., TAKEUCHI, M., SHIMIZU, K., ARAI, M. (1978) J. Antibiotics 31: 1203-1205

(58) LAEMMLI, U.K. (1970) Nature 227: 680-685

(59) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.J., RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265-275

(60) LUKTENHAUS, J.F. (1977) J. Bacteriol. 131: 631-637

(61) DeMARTINI, M., INOUYE, M. (1978) J. Bacteriol. 133: 329-335

(62) McINTYRE, T.M., CHAMBERLAIN, B.K., WEBSTER, R.E., BELL, R.M. (1977) J. Biol. Chem. 252: 4487-4493

(63) MELCHERS, F., BRAUN, V., GALANOS, C. (1975) J. Exp. Med. 142: 473-482

(64) MEYENBURG, K. von, NIKAIDO, H. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 78: 1100-1107

(65) MICHEL, P.F., STÄRKA, J. (1979) FEBS Lett. 108: 261-265

(66) MIZUMO, T., KAGEYAMA, M. (1979) J. Biochem. 85: 115-122

(67) MOLLNER, S. (1980) Diplomarbeit, Universität Tübingen, Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie II

(68) MYAZAWA, T. (1962) in *Polyamino Acids, Polypeptides, and Proteins* (Stahlmann, M.A. ed.) pp 201-217, Wisconsin University Press

(69) MYER, J.P. (1969) Biophys. J. 9: A-215

(70) NAKAE, T. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 71: 877-884

(71) NAKAE, T. (1976) J. Biol. Chem. 251: 2176-2178

(72) NAKAE, T., NIKAIDO, H. (1975) J. Biol. Chem. 250: 7359-7365

(73) NISHIJIMA, M., NAKAIKE, Y., TAMORI, Y., NOJIMA, S. (1977) Eur. J. Biochem. 73: 115-124

(74) NISHIJIMA, M., SAEKI, T., TAMORI, Y., DOI, O., NOJIMA, S. (1978) Biochim. Biophys. Acta 528: 107-118

(75) NUNN, W.D., KELLY, D.L., STUMMFALL, M.Y. (1977) J. Bacteriol. 132: 526-531

(76) OHKI, M., DOI, O., NOJIMA, S. (1972) J. Bacteriol. 110: 864-869

(77) OSBORN, M.J., GANDER, Y.E., PARISI, E., LARSON, J. (1972) J. Biol. Chem. 247: 3962-3972

(78) PAPACOSTIDIS, G., ZUNDEL, G., MEHL, E. (1972) Biochim. Biophys. Acta 288: 277-281

(79) PATRIARCA, P., BECKERDITE, S., ELSBACH, P. (1972) Biochim. Biophys. Acta 260: 593-600

(80) Pharmacia, Uppsala Schweden: Gel filtration in Theory and Praxis

(81) PLUSCHKE, G., HIROTA, Y., OVERATH, P. (1978) J. Biol. Chem. 253: 5048-5055

(82) PONTA, H., PON, C.L., HERRLICH, P., GUARLERSI, C., HIRSCH-KAUFFMANN, M., PFENNIG-YEH, M., RAHMSDORF, H.-J., SCHWEIGER, M. (1975) Eur. J. Biochem. 59: 261-270

(83) PONTA, H., REEVE, J.N., PFENNIG-YEH, M., HIRSCH-KAUFFMANN, M., SCHWEIGER, M., HERRLICH, P. (1977) Nature 269: 440-442

(84) RAETZ, C.R.H. (1978) Microbiol. Rev. 42: 614-659

(85) REYNOLDS, J.A., TANFORD, C. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 66: 1002-1007

(86) RICARD, M., HIROTA, Y. (1973) J. Bacteriol. 116: 314-322

(87) DiRIENZO, J.M., NAKAMURA, K., INOUYE, M. (1978) Am. Rev. Biochem. 47: 481-532

(88) ROSENBUSCH, J.P. (1974) J. Biol. Chem. 249: 8019-8029

(89) ROSENKRANZ, H. (1974) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12: 415-422

(90) ROSENKRANZ, H., SCHOLTAN, W. (1971) Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 352: 896-904

(91) ROTERING, H. (1975) Diplomarbeit, Universität Tübingen, Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie II

(92) ROTERING, H., BRAUN, V. (1977) FEBS Lett. 83: 41-44

(93) ROTERING, H., BRAUN, V. (1978) Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 359: 312-313

(94) SALTON, M.R.J. (1964) in *The Bacterial Cell Wall*, Elsevier, Amsterdam

(95) SCHALLER, K. persönliche Mitteilung

(96) SCHLECHTER, A.N., EPSTEIN, C.J. (1968) J. Mol. Biol. 35: 567-589

(97) SCHNAITMANN, C.A. (1974) J. Bacteriol. 118: 442-453

(98) SCHNAITMANN, C.A. (1979) J. Bacteriol. 138: 869-875

(99) SCHNEIDER, G. (1970) Dissertation, Universität Tübingen

(100) SCHULMAN, H., KENNEDY, E.P. (1977) J. Biol. Chem. 252: 4250-4255

(101) SKURRAY, R.A., HANCOCK, R.E.W., REEVES, P. (1974) J. Bacteriol. 119: 726-735

(102) SNIDER, M.D., KENNEDY, E.P. (1977) J. Bacteriol. 130: 1072-1083

(103) SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H., MOORE, S. (1958) Anal. Chem. 30: 1190-1206

(104) STAHL, E. (1962) *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer Verlag, Berlin

(105) STEINHARDT, J. (1975) in *Protein - Ligand Interactions* (Sund, H., Blauer, G. eds.) pp 412-424, Walter de Gruyter, Berlin

(106) SUZUKI, H., NISHIMURA, Y., IKETANI, H., CAMPISI, J., HIRASHIMA, A., INOUYE, M., HIROTA, Y. (1976) J. Bacteriol. 127: 1494-1501

(107) SZMELCMAN, S., HOFNUNG, M. (1975) J. Bacteriol. 124: 112-118

(108) SZMELCMAN, S., SCHWARTZ, M., SILHAVY, J., BOOS, W. (1976) Eur. J. Biochem. 65: 13-19

(109) TANFORD, C., REYNOLDS, J.A. (1976) Biochim. Biophys. Acta 457: 113-170

(110) TOMOEDA, M., INUZAKA, N., KUBO, N., NAKANO, S. (1968) J. Bacteriol. 95: 1078-1089

(111) URRY, D.W. (1972) Biochim. Biophys. Acta 265: 115-168

(112) WALLACH, D.F.H., ZAHLER, P.H. (1968) Biochim. Biophys. Acta 150: 186-193

(113) WEIDEL, W., FRANK, H., MARTIN, H.H. (1960) J. Gen. Microbiol. 22: 159-166

(114) WITHOLT, B., HEERIKHUIZEN, H. van, LEIJ, L. de (1976) Biochim. Biophys. Acta 443: 534-544

(115) YAGIL, E., BEACHAM, J.R., NISSIM, A., PRICE, G. (1978) FEBS Lett. 85: 133-136

(116) YU, F., MIZUSHIMA, S. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 74: 1397-1402

LEBENSLAUF

	Heinz Rotering geboren am 7. Mai 1947 in Göppingen
1953 - 1957	Besuch der Hieber-Grundschule in Uhingen
1957 - 1966	Besuch des Freihof-Gymnasiums in Göppingen, neusprachlicher Zweig
24. 2. 1966	Reifezeugnis
1966 - 1968	Wehrdienst
ab Sommersemester 1968	Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie an der Universität Tübingen
ab Sommersemester 1974	Biologiestudium an der Universität Tübingen
Sommersemester 1975	Anfertigung der Diplomarbeit "Lipoprotein aus der Zellhülle von E. coli: Charakterisierung, Vorschläge zur Sekundär- und Tertiärstruktur"
19. 9. 1975	Diplom-Hauptprüfung in Biologie Hauptfach Mikrobiologie
Wintersemester 1975/76 bis Wintersemester 1979/80	Erstellung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. V. Braun

Meine wichtigsten akademischen Lehrer waren

E. Bayer, V. Braun, E. Bünning, H. Dieckmann, K.G. Grell, H. Krüger, W. Loeffler, H. Mauser, H. Metzner, K. Moerike, E. Müller, H. Probst, W. Rüdorff, W. Seyffert, W. Voelter, G. Weitzel, U. Weser, H. Wolf, H. Zähner